

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT**

**PAR
JEAN-FRANÇOIS VERMETTE**

**CARACTÉRISATION MICROBIOLOGIQUE ET POSSIBILITÉS
D'AMÉLIORATION DU BIOFILTRE DE NORISK HYDRO CANADA INC. POUR
L'ENLÈVEMENT D'AMMONIAC**

JANVIER 2008

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Dans le cadre d'un travail d'envergure comme ce projet de maîtrise, plusieurs personnes vous donnent un petit, voir un grand coup de main, que ce soit du point de vue technique ou du support moral. Si on fait la somme de ces collaborations, on constate qu'elles constituent les fondements essentiels du travail, sur lesquels tout repose.

Je voudrais tout d'abord remercier le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada pour leur soutien financier via une bourse d'études supérieures à incidence industrielle (ESII).

Le professeur Marc Sirois et Jean Laperrière, pour m'avoir dirigé de main de maître.

L'équipe de Norsk Hydro : Bertin Ouellet, Pierre Gélinas, Pierre Lavallée, Claire Desrosiers, Serge Tremblay, Alain Morin, Nicole Grenon

L'équipe du laboratoire de Marc Sirois : Valérie Ouellet, Marie-Édith Nepveu-Traversy, Karine de Carufel, Annet Lavallée

Le personnel de l'UQTR : professeur Jacques Boisvert, Micheline Ménard-Boulianne, Yves Hurtubise

Personnel du CRIQ : Nicolas Turgeon, Yann LeBihan

...et à ceux que j'oublie, MERCI!

RÉSUMÉ

Le procédé de production de magnésium de Norsk Hydro Canada Inc. engendre un déchet dangereux hydro-réactif appelé SPEFs. Ces SPEFs sont désactivés dans un bioréacteur, ce qui dégage d'importantes quantités d'ammoniac gazeux qui est traité par un biofiltre, réduisant ainsi les impacts environnementaux. Ce biofiltre utilise le principe de la nitrification, soit la transformation d'ammoniac en nitrites puis en nitrates par des bactéries nitrifiantes autotrophes. Ce procédé environnemental est remarquablement efficace, malgré le fait que les conditions du biofiltre soient défavorables aux bactéries nitrifiantes. L'activité de ces bactéries, mesurée en laboratoire, est très faible; nous ignorons donc le réel processus menant à l'enlèvement d'ammoniac dans le biofiltre de Norsk Hydro. Les objectifs de nos travaux étaient d'étudier les aspects microbiologiques de ce biofiltre pour en comprendre davantage le fonctionnement et d'évaluer les possibilités d'en améliorer l'efficacité. Ce travail comportait deux volets expérimentaux. Le premier visait à étudier les bactéries hétérotrophes facilement cultivables du biofiltre, dont on voulait s'enquérir de l'abondance et du rôle dans le procédé. Nous avons isolé et dénombré ces bactéries et les avons identifiées par réaction PCR suivit du séquençage du gène de l'ARN 16S. Nous avons ensuite réalisé des tests biochimiques pour évaluer leur potentiel de transformation de certaines formes d'azote. Ce volet a montré que les bactéries hétérotrophes sont plus nombreuses qu'escompté, avec environ 10^7 cfu/g de milieu filtrant. Elles sont principalement de l'espèce *Bacillus*, sont capables de transformer le nitrite et le nitrate en gaz et autres produits et jouent sans doute un rôle important dans le biofiltre. Des interactions complexes entre les nombreuses bactéries d'un consortium sont probablement à l'origine de l'enlèvement d'ammoniac, plutôt que la nitrification autotrophe comme seul processus. Le second volet visait à explorer une façon d'améliorer l'efficacité du procédé. Nous avons réalisé des études d'enlèvement d'ammoniac dans la solution liquide de SPEFs par *Vibrio alginolyticus*, une bactérie halophile isolée de l'eau de mer. Suite à plusieurs tests en laboratoire où nous reproduisons les conditions du bioréacteur, cette bactérie enlevait en moyenne 110 mg N-NH₄/l/jour dans le liquide hautement salin et alcalin, lorsque nous y ajoutons une source de carbone et une source de phosphore. Ces résultats sont très intéressants et

Norsk Hydro aurait grand intérêt à reproduire pareil enlèvement d'ammoniac dans leur bioréacteur. Cela permettrait une meilleure efficacité du biofiltre, un traitement plus rapide des SPEFs et une diminution des rejets d'ammoniac à l'environnement.

Mots clés : ammoniac, *Bacillus*, bactéries nitrifiantes, biofiltration, halophile, microbiologie environnementale appliquée, *Vibrio alginolyticus*

IMPLICATION DES AUTEURS POUR LES ARTICLES

J'ai réalisé l'ensemble des travaux en laboratoire mentionnés dans les deux articles scientifiques. J'ai participé à l'analyse et l'interprétation des résultats et j'ai rédigé les manuscrits.

Jean Laperrière a fourni le support technique pour le procédé de traitement des SPEFs à Norsk Hydro, a participé à l'analyse et l'interprétation des résultats et a révisé les manuscrits.

Marc Sirois a supervisé les expériences microbiologiques au laboratoire de l'UQTR, a participé à l'analyse et l'interprétation des résultats et a révisé les manuscrits.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ	iii
IMPLICATIONS DES AUTEURS POUR LES ARTICLES.....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	xi
CHAPITRE I INTRODUCTION	1
1.1 L'usine de Norsk Hydro Canada Inc.	1
1.1.1 Description de l'usine et de son procédé	1
1.1.2 La problématique des SPEFs.....	3
1.1.3 Le bioréacteur et son biofiltre.....	6
1.2 Historique de la biofiltration.....	10
1.3 Microbiologie du cycle de l'azote	12
1.3.1 Caractéristiques des bactéries nitrifiantes.....	13
1.3.2 Anciens paradigmes et découvertes récentes.....	17
1.4 Problématique et objectifs	19
1.4.1 Objectifs spécifiques du premier volet	22
1.4.2 Objectifs spécifiques du second volet.....	24
CHAPITRE II ARTICLE SCIENTIFIQUE 1	27
2.1 Characterization of the heterotrophic biomass of an industrial organic biofilter with removal of high load ammonia gas.....	27
2.2 Abstract.....	28
2.2.1 Background.....	28

2.2.2 Results	28
2.2.3 Conclusions	28
2.3 Background.....	29
2.4 Results	31
2.4.1 Bacterial counts	31
2.4.2 Biochemical tests for nitrogen transformation	31
2.4.3 Bacterial identification by 16S rRNA gene sequencing.....	32
2.5 Discussion.....	33
2.6 Conclusions	34
2.7 Methods	35
2.7.1 Peat sampling.....	35
2.7.2 Bacterial counts and isolation.....	36
2.7.3 Biochemical tests for nitrogen transformation	36
2.7.4 Bacterial identification by 16S rRNA gene sequencing.....	37
2.8 Author's contributions	38
2.9 Acknowledgements.....	38
2.10 References.....	39
2.11 Figure.....	42
2.12 Tables.....	43
CHAPITRE III ARTICLE SCIENTIFIQUE 2.....	45
3.1 Ammonia removal in a saline industrial wastewater by <i>Vibrio alginolyticus</i>	45
3.2 Abstract.....	46
3.3 Introduction.....	46

3.4 Materials and methods.....	48
3.4.1 Strain and media used.....	48
3.4.2 Wastewater composition.....	49
3.4.3 Experimental setup	50
3.4.4 Samples preparation and chemical analyses.....	52
3.5 Results	52
3.5.1 Testing different phosphorus sources	52
3.5.2 Bacterial counts	54
3.5.3 Ammonia removal efficiency	54
3.6 Discussion.....	55
3.7 Conclusions	57
3.8 Acknowledgements.....	57
3.9 References.....	58
CHAPITRE IV DISCUSSION.....	60
4.1 Premier volet : bactéries hétérotrophes du biofiltre.....	60
4.1.1 Synthèse des résultats	60
4.1.2 Interprétation et perspectives de recherche.....	62
4.2 Second volet : tests d'enlèvement d'ammoniac avec <i>V. alginolyticus</i>	64
4.2.1 Synthèse des résultats	64
4.2.2 Interprétation et perspectives de recherche.....	66
CHAPITRE V CONCLUSIONS.....	69
BIBLIOGRAPHIE	71
ANNEXES	74

LISTE DES TABLEAUX

1.1	Caractéristiques de la solution de SPEFs.....	25
2.1	Bacterial counts on TSA plates.....	43
2.2	Nitrogen transformation in the PMSA media by isolated strains	43
2.3	16S rRNA identification of isolated strains	44
3.1	Bacterial counts in pure cultures of <i>V. alginolyticus</i>	49
3.2	Chemical characteristics of the FEBPs wastewater	50
3.3	Ammonia removal by <i>V. alginolyticus</i> in FEBPs wastewater under different conditions.....	53

LISTE DES FIGURES

1.1	Vue aérienne de NHCI.....	2
1.2	Blocs de SPEFs dans un entrepôt de NHCI.....	4
1.3	Photo du bioréacteur de NHCI.....	6
1.4	Schéma du bioréacteur de NHCI	8
1.5	Utilisation des boues pour amendement magnésien	9
1.6	Schématisation du cycle de l'Azote.....	13
1.7	Photographies de bactéries nitrifiantes en microscopie électronique <i>Nitrosomonas europaea</i> en A et <i>Nitrobacter winogradskyi</i> en B.....	14
1.8	<i>V. alginolyticus</i> en microscopie électronique	26
2.1	The bioreactor for FEBPs treatment at NHCI	42
3.1	The bioreactor for FEBPs treatment at NHCI	48
3.2.	Experimental setup	51

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

AMO	ammoniac mono-oxygénase
anammox	oxydation anaérobie de l'ammoniac
AOB	bactérie oxydant l'ammoniac
BLAST	« basic local alignment search tool »
cfu	unité formatrice de colonie
COV	carbone organique volatil
CRIQ	Centre de recherche industriel du Québec
HAO	hydroxylamine oxydoréductase
NCBI	« national center for biotechnology information »
NHCI	Norsk Hydro Canada Inc.
NO	nitrite oxydoréductase
NOB	bactérie oxydant le nitrite
OGM	organisme génétiquement modifié
PCR	réactions en chaîne de la polymérase
PMSA	« peptone-meat extract soft agar »
SPEFs	sous-produits de l'électrolyse et la fonderie (se dit FEBPs en anglais)
STPP	sodium tri-polyphosphate
TCBS	« thiosulfate citrate bile sucrose agar », milieu de culture spécifique aux <i>Vibrio</i>
TSA	« tryptic soy agar », milieu de culture non-sélectif

CHAPITRE I

INTRODUCTION

L'essor des sciences environnementales durant les dernières décennies nous a permis de constater que notre rythme de consommation actuel entraîne de sérieuses répercussions sur la biosphère. L'opinion publique, de plus en plus sensible à ces préoccupations, incite les gouvernements à imposer aux industries des normes environnementales de plus en plus strictes. Il existe néanmoins des industries avant-gardistes qui accordent beaucoup d'importance à la recherche et au développement de nouvelles technologies environnementales, plutôt que de se contenter de respecter les normes. Norsk Hydro Canada Inc. (NHCI), qui a permis à ce projet de maîtrise de prendre forme, constitue l'une de ces entreprises. L'objectif général est de mieux caractériser et d'améliorer un procédé biologique prometteur, au profit de l'environnement et de l'industrie. Le procédé en question, soit la biofiltration d'ammoniac par des bactéries nitrifiantes, est utilisé depuis plusieurs années, avec une efficacité très raisonnable. Malgré cela, l'application de cette technologie qui implique des organismes vivants au métabolisme complexe, demeure compliquée et mystérieuse sur bien des points. Ce projet de recherche a donc été stimulé par le désir de comprendre davantage la nitrification et les micro-organismes impliqués, avec objectif ultime d'améliorer le rendement de l'usine dans une optique de développement durable.

1.1 L'usine de Norsk Hydro Canada Inc.

1.1.1 Description de l'usine et de son procédé

Ce projet de recherche en milieu industriel n'aurait pas été possible sans la participation d'une entreprise parraineuse, soit NHCI. Nous débuterons donc ce mémoire en introduisant sommairement cette industrie. NHCI est une usine productrice de magnésium pur et d'alliages, située dans le parc industriel de Bécancour. Elle appartient à la compagnie Hydro (anciennement Norsk Hydro), une multinationale fondée en 1905 en Norvège et qui œuvre dans plusieurs domaines. Parmi les secteurs

d'activité d'Hydro, on compte l'énergie (combustibles fossiles, énergie éolienne, hydrogène), les métaux légers (aluminium, magnésium) et les polymères. Hydro emploie 33 000 personnes dans près de 40 pays (www.hydro.com). L'usine NHCI de Bécancour ne constitue donc qu'une infime partie de la multinationale Hydro. Néanmoins elle ne passe pas inaperçue, avec sa tour de déshydratation haute de plus de 75 m, ce qui en fait le plus haut bâtiment entre Montréal et Québec (figure 1.1).

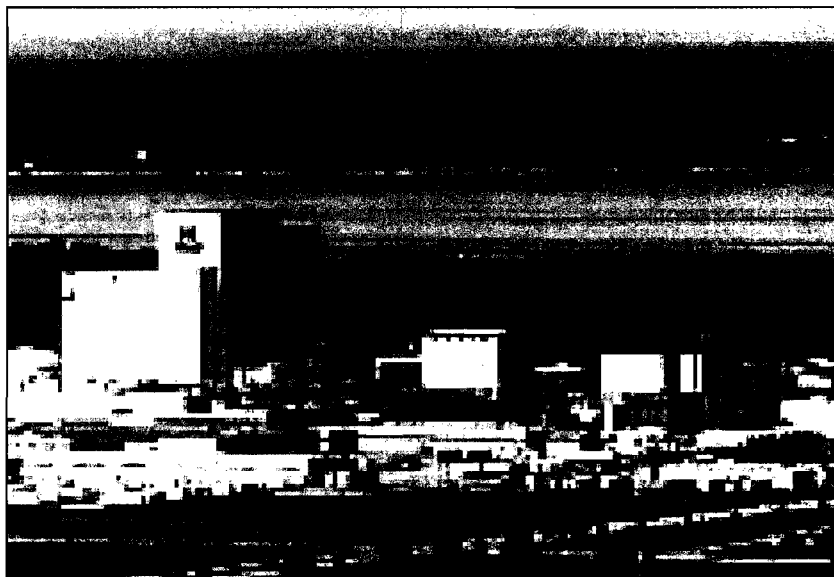


FIGURE 1.1 : vue aérienne de NHCI
(Source : NHCI)

NHCI produit du magnésium; ce métal possède des propriétés semblables à l'aluminium, tout en étant plus dur et plus léger. Ces deux métaux sont souvent utilisés dans un même alliage, notamment dans l'industrie de l'automobile. La fabrication de voitures est d'ailleurs la première utilisation de magnésium au niveau mondial. NHCI utilise un procédé de fabrication de magnésium unique au monde, dont voici les principales étapes. Tout d'abord la matière première, la magnésite, arrive des quatre coins du monde par voie navale. Les principaux pays fournisseurs sont la Chine, l'Australie et l'Espagne. La magnésite est une roche blanche d'apparence banale, composée en grande partie de carbonate de magnésium (MgCO_3). La première étape de transformation est la dissolution de la roche. On plonge la magnésite concassée dans de l'acide chlorhydrique (HCl) et on chauffe jusqu'à obtention d'une saumure de chlorure

de magnésium (MgCl_2). La prochaine étape est la déshydratation, où des gouttelettes de saumures sont transformées en granules de MgCl_2 anhydres par des séchoirs à la vapeur puis au HCl gazeux. Ces granules sont ensuite acheminées vers le bâtiment de l'électrolyse, où de puissants champs électriques y séparent le magnésium métallique (Mg) du chlore gazeux (Cl_2). Le Cl_2 ainsi produit est récupéré afin de synthétiser de l'acide chlorhydrique, utilisé en grande quantité dans le procédé de l'usine. On achemine finalement le magnésium à la fonderie pour y être moulé en lingots. De l'aluminium ainsi que d'autres métaux peuvent y être ajoutés pour former des alliages, selon les besoins du client. NHCI produit de cette façon environ 45 000 tonnes de magnésium par année, depuis 1992. Cependant, à l'automne 2006 la compagnie Hydro décide de mettre un terme à ses activités dans le domaine du magnésium, pour des raisons économiques. La production de lingots arrête donc au printemps 2007. Heureusement, la fermeture n'a pas nuit au déroulement ni à la pertinence de ce projet de recherche puisque le procédé qui nous intéresse, le bioréacteur, dont nous parlerons en détails dans les sections qui suivent, restera en fonction environ 3 à 5 ans après l'arrêt de production de magnésium.

1.1.2 La problématique des SPEFs

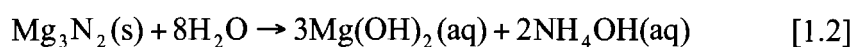
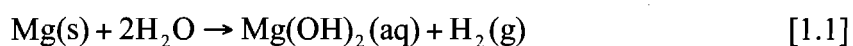
Comme toute usine, NHCI produit des déchets industriels. Un de ces déchets est au cœur de la problématique de ce projet de maîtrise ; les sous-produits de l'électrolyse et de la fonderie (SPEFs). Ces résidus sont extraits lors du curage fréquent des cuves de l'électrolyse et des fours de la fonderie. Lorsque retirés des fours, les SPEFs chauds s'apparentent à une boue de couleur grise. Cette boue est coulée dans un contenant métallique d'environ 1 m^3 et, une fois refroidie, elle prend la forme d'un bloc compact s'effritant en fine poudre grise. La figure 1.2 illustre un entrepôt de blocs de SPEFs de NHCI.

Les SPEFs ont une composition très complexe. Ils sont constitués principalement de chlorures (NaCl , CaCl_2 , MgCl_2), d'oxydes (MgO , Al_2O_3 , CaO), de métaux (Mg , Al), de nitrures (Mg_3N_2 , Al_2N_3) et de fluorures (CaF_2 , MgF_2). Leur contenu en ions métalliques rend les SPEFs très hydro-réactifs, ce qui en fait un déchet dangereux.



FIGURE 1.2 : Blocs de SPEFs dans un entrepôt de NHCI
(Source : NHCI)

Le contact avec l'eau provoque des réactions exothermiques dégageant un mélange de gaz ; de l'ammoniaque (NH_3), de l'hydrogène (H_2), de la phosphine (PH_3), de l'arsine (AsH_3), et du silane (SiH_4). Les deux gaz les plus importants en quantité et représentant le plus grand danger sont le NH_3 et le H_2 , qui sont formés de la façon suivante :



Les dégagements d'hydrogène gazeux sont très problématiques à causes des risques d'explosion engendrés. Afin de désactiver ce déchet de façon sécuritaire, il faut donc y ajouter de l'eau dans des conditions contrôlées, en injectant de grandes quantités d'air afin de diluer l' H_2 et rester en-deçà de la limite inférieure d'explosivité de ce gaz, qui se situe à 4% V/V. Cependant, la solubilisation des SPEFs couplée à une grande aération entraîne inmanquablement la volatilisation de NH_3 gazeux par « stripping », et ce à des concentrations atteignant 400 ppm, ce qui constitue un problème environnemental majeur. À titre comparatif, les normes québécoises de dégagement

d'ammoniac en milieu industriel sont fixées à 25 ppm. Les problèmes reliés aux dégagements de NH_3 sont nombreux. Tout d'abord, ce gaz possède une odeur caractéristique désagréable très irritante pour les voies respiratoires, occasionnant un danger direct pour la santé des humains et pour toutes les espèces exposées. Les dégagements de NH_3 gazeux peuvent aussi réagir avec divers oxydants atmosphériques, tels que le dioxyde de soufre (SO_2) et l'ozone (O_3), formant du sulfate d'ammonium, du nitrate d'ammonium et autres aérosols néfastes (Joshi 2000). Éventuellement, ces particules tombent dans l'eau où elles causent l'eutrophisation, ou encore sur terre où elles stimulent la nitrification, entraînant l'acidification des sols et la production de nitrites (NO_2^-) et nitrates (NO_3^-). Ces ions solubles peuvent alors diffuser dans la nappe phréatique, occasionnant des problèmes de santé si l'eau est consommée. Cette contamination constitue un risque de cancer de l'estomac et de méthémoglobinémie, maladie caractérisée par un mauvais fonctionnement des globules rouges (Camargo et Alonso 2006).

Connaissant ces impacts sur la santé et sur l'environnement, il est donc inconcevable de désactiver les SPEFs et laissant l'ammoniac s'échapper librement à l'atmosphère. À ses débuts, NHCI ne disposait pas de méthode adéquate pour éliminer ces sous-produits, qui étaient donc entreposés le plus sécuritairement possible en attendant de trouver une solution viable. La clé de cet entreposage était d'éviter le contact du produit avec l'eau et l'humidité de l'air, afin de limiter au maximum les dégagements gazeux. Les blocs de SPEFs étaient donc emballés individuellement dans une membrane de plastique et stockés dans plusieurs conteneurs et entrepôts sur le site de NHCI, et ce depuis le départ de l'usine en 1992. Avec les années, ce sont plus de 20 000 tonnes de SPEFs qui ont ainsi été accumulés. En plus d'être coûteux, cet entreposage demande beaucoup de travail et de suivi environnemental. On doit s'assurer de l'étanchéité des conteneurs en les inspectant et les peignant fréquemment. Des analyses d'ammoniac et d'hydrogène doivent être effectuées plusieurs fois par année dans chaque conteneur et entrepôt, pour s'assurer qu'il n'y ait pas de danger d'explosion ou de toxicité.

Différents projets de recherche ont donc été mis en branle par le service environnement de NHCI afin de développer un moyen d'éliminer les SPEFs de façon saine et sécuritaire. Un de ces projets a abouti à un partenariat avec le Centre de recherche industrielle du Québec (CRIQ) pour développer un biofiltre à bactéries nitrifiantes permettant d'éliminer les rejets d'ammoniac produits par la désactivation des SPEFs. Cette technologie a d'abord été testée à l'aide d'un montage pilote à échelle réduite. Le succès de ces expérimentations préliminaires a mené à l'installation du vrai bioréacteur surmonté d'un biofiltre, à l'automne 2003.

1.1.3 Le bioréacteur et son biofiltre

Le bioréacteur de NHCI et son biofiltre ont été construits au coût approximatif de 5M \$. La figure 1.3 présente une photographie du bioréacteur alors que la figure 1.4 illustre son fonctionnement général, dont nous détaillerons les principales étapes.

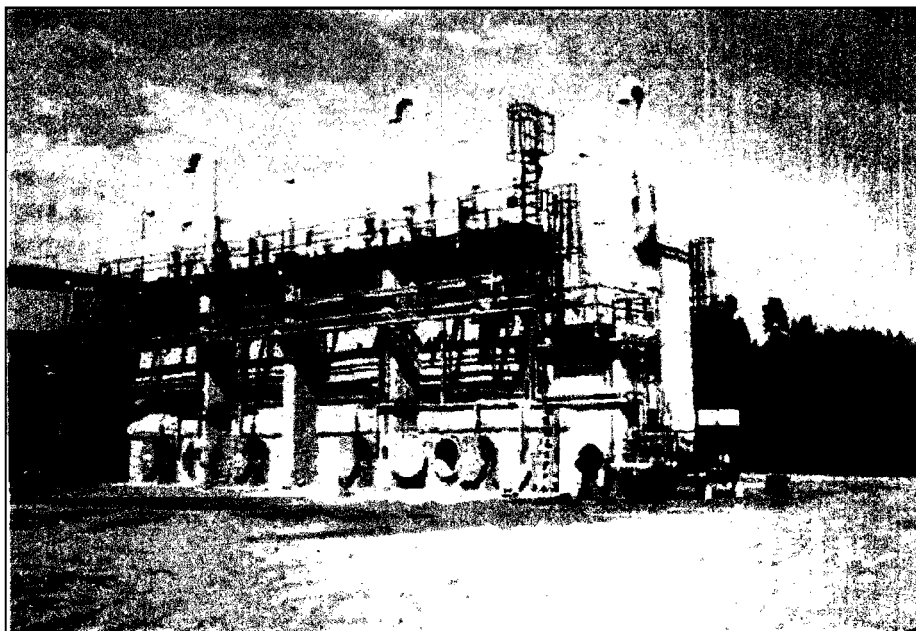


FIGURE 1.3 : Photo du bioréacteur de NHCI
(Source : NHCI)

Le traitement commence par le broyage des blocs de SPEFs. Par le fait même, on récupère autant de Mg métallique que possible afin de le retourner au procédé et

diminuer les pertes. Cette étape est d'une importance capitale, car non seulement on récupère du métal mais cela permet également de réduire la quantité d' H_2 dégagé dans le bioréacteur, qui est formé par la réaction du magnésium avec l'eau (éq. 1.1). La poudre de SPEFs obtenue est ajoutée en continu au bassin du bioréacteur où elle est dissoute avec de l'eau filtrée, ce qui produit l'oxydation des résidus de magnésium métalliques n'ayant pas pu être enlevés. C'est alors que se forment les dégagements gazeux, constitués en majorité de H_2 et de NH_3 , tel que mentionné à la section 1.2. Le bioréacteur est conçu pour accepter 10 tonnes de SPEFs broyés par jour, soit environ 400 kg/heure, dissous dans 2.7 m³/heure d'eau filtrée (Laperrière et Courcy, 2001). Des agitateurs à hélices assurent un brassage efficace de la solution. Un système de barbotage injecte de grandes quantités d'air dans le bassin, à un débit d'environ 10 000 m³/heure. Cette aération joue plusieurs rôles importants dans le procédé : 1) elle participe au brassage efficace de la solution 2) elle permet d'abaisser la concentration d' H_2 à un niveau sécuritaire 3) elle permet le développement des bactéries nitrifiantes dans le biofiltre grâce à un apport élevé en oxygène (O_2) et en dioxyde de carbone (CO_2).

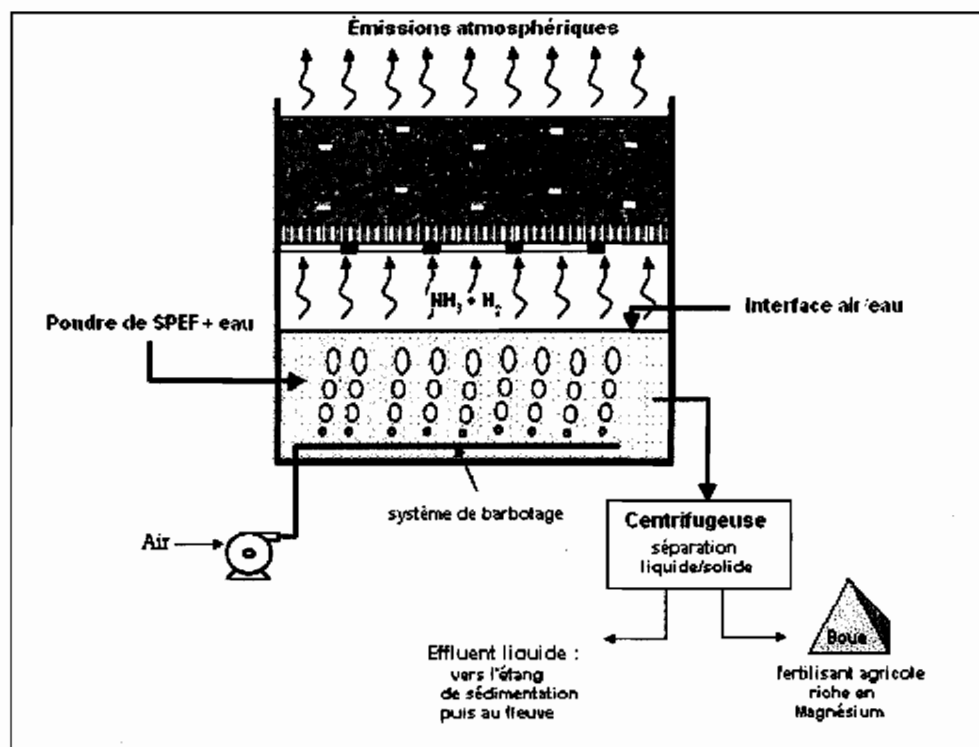
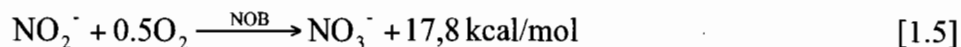
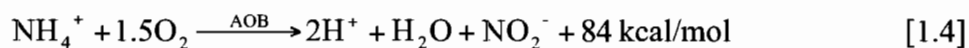


FIGURE 1.4 : Schéma du bioréacteur de NH_4Cl
(Source : modifié de Turgeon et al. 2004)

Les gaz sont donc confinés à traverser un biofiltre BIOSOR^{MD}, technologie développée par le CRIQ. Ayant une surface de 140 m² pour une épaisseur d'environ 1 m, le biofiltre est composé de tourbe et de copeaux de bois, qui servent de support aux bactéries nitrifiantes. Ces bactéries peuvent être classées en deux groupes, soit les bactéries oxydant l'ammoniac (AOB) et les bactéries oxydant le nitrite (NOB). Elles transforment l'ammoniac en nitrates par deux réactions successives leur permettant de produire de l'énergie de façon autotrophe :



On constate que la première réaction (éq. 1.4) mène à l'acidification du milieu par production d'ions H^+ . Afin de neutraliser cette acidité, des pastilles de calcite (CaCO_3) sont insérées dans le biofiltre et permettent de maintenir un pH favorable aux bactéries, soit entre 6,5 et 8,0. De plus, le carbonate fourni par la calcite constitue une source de

carbone inorganique assimilable par les bactéries nitrifiantes. Les caractéristiques de ces bactéries seront explorées davantage à la section 1.1.3.

Le mélange de SPEFs désactivés et d'eau se déverse en continu dans un réservoir de pompage, à l'autre extrémité du bioréacteur. À cette étape du processus, la solution contient 5% de matière solide, que l'on sépare de la phase liquide par centrifugation et avec l'aide d'un flocculant. L'eau recueillie à la sortie de la centrifugeuse contient des chlorures et des composés azotés provenant de la désactivation des SPEFs. On achemine cette eau usée vers l'étang de sédimentation de NHCI, où séjournent tous les rejets liquides de l'usine. Cet étang permet de décanter et de neutraliser le pH des effluents avant de les rejeter au fleuve. Quant à la phase solide recueillie par la centrifugeuse, elle possède des caractéristiques très intéressantes permettant sa valorisation. Cette boue de couleur grise est riche en magnésium et est vendue pour amendement magnésien des terres agricoles. Elle est d'abord mélangée aux boues de la dissolution, un autre déchet industriel de NHCI riche en magnésium, avant d'être acheminée par camion à différents agriculteurs de la région. Le contenu magnésien de ces boues a un effet positif sur la santé des plantes et sur l'apparence du feuillage (le Mg est d'ailleurs l'atome central de la molécule de chlorophylle). La figure 1.5 montre le résultat d'une étude préliminaire de valorisation de ces boues.

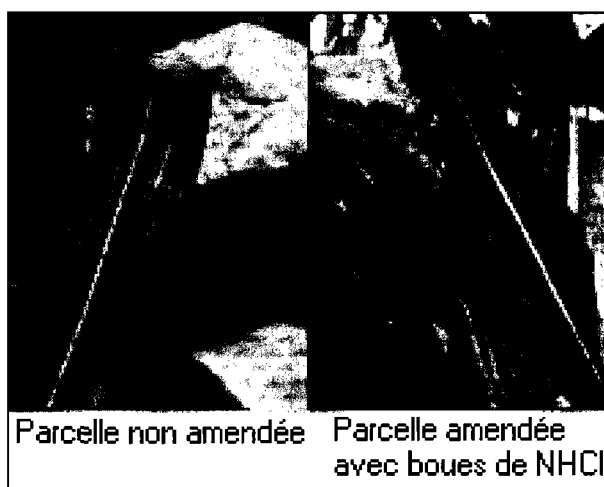


FIGURE 1.5 : Utilisation des boues pour amendement magnésien
(Source : NHCI)

Quant aux rejets gazeux du bioréacteur, ils sont échantillonnés en continu par des sondes de NH_3 et de H_2 situées en-dessous et au-dessus du biofiltre. Ce système permet aux opérateurs de contrôler l'alimentation de SPEFs à l'entrée du bioréacteur afin de respecter les normes de sécurité pour l'hydrogène et les normes environnementales pour l'ammoniac. Ces normes sont fixées à 11 ppm d' H_2 et 25 ppm de NH_3 . Ces sondes permettent aussi de suivre l'efficacité d'enlèvement d'ammoniac du procédé. Le biofiltre est aussi muni d'un système de lavage et d'humidification, situé à sa surface et en dessous du milieu filtrant. Son but est de laver le filtre, dans lequel peut s'accumuler des particules solides entraînées par le gaz ainsi que des substances pouvant inhiber l'efficacité des bactéries lorsque trop concentrées (NH_3 , NO_3^- et NO_2^-). On l'utilise à fréquence variable, selon les besoins et selon les précipitations extérieures. Ce système permet aussi d'ajouter des nutriments au biofiltre lors des arrêts planifiés du bioréacteur, qui privent les bactéries de leur apport en NH_3 , essentiel à leur développement.

1.2 Historique de la biofiltration

Par définition, la biofiltration consiste en la dégradation de composés indésirables par des microorganismes fixés à un support. Cette technique au sens large a d'abord été utilisée en phase liquide ; on s'en sert depuis plusieurs décennies pour le traitement des eaux potables et des eaux usées. Cependant, son utilisation pour les rejets gazeux est relativement récente. De nos jours, on traite l'air de multitudes d'industries différentes avec cette technologie, que ce soit dans le domaine alimentaire, pharmaceutique, de l'industrie animale, des industries chimiques, etc. Initialement, la fonction de ces biofiltres était de réduire le dégagement d'odeurs indésirables en dégradant les composés organiques volatils (COV) et le sulfure d'hydrogène (H_2S) avec des bactéries en aérobie. Le design de base d'un biofiltre est extrêmement simple : un lit filtrant traversé par un gaz à épurer. Le milieu filtrant qui compose le lit offre un support et une protection aux microorganismes, en plus de retenir l'humidité et de faciliter l'accès aux nutriments. Le milieu doit posséder une porosité idéale permettant une bonne diffusion dans le lit, avec un temps de rétention suffisamment grand pour permettre au gaz d'être efficacement filtré. Traditionnellement le support était constitué de compost, de tourbe ou de copeaux

de bois. Ce sont d'ailleurs des matériaux encore fréquemment utilisés de nos jours. Ces milieux filtrants contiennent habituellement la diversité microbienne nécessaire à la purification des gaz ; nul besoin d'ajouter de microorganismes provenant de sources extérieures. Parmi les millions de génotypes microbiens présents dans filtre, les mieux adaptés aux conditions locales prolifèrent en assimilant les composés gazeux. Cependant, l'ajout d'un consortium bactérien peut aider ou même être nécessaire au démarrage de certains types de biofiltres.

La biofiltration a surtout été développée en Allemagne et aux Pays-Bas, durant les 50 dernières années (Bellis 2007). Les premiers travaux sur la biofiltration d'effluents gazeux datent cependant de 1923, alors qu'un allemand du nom de Bach étudiait les possibilités de dégrader le H_2S pour l'enlèvement des odeurs. On doit cependant attendre les années 1950 avant de voir la mise en application des concepts de Bach, alors que des installations sont érigées en Allemagne de l'Ouest (1955) et en Californie (1957). En 1959 à Nuremberg, on installe avec succès un biofiltre à base de terre pour l'enlèvement des odeurs d'une usine de traitement d'égouts. Durant les années 1960 et 1970, plusieurs biofiltres sont installés aux Pays-Bas et en Allemagne pour le traitement des COV et des gaz odorants dans des usines de traitement d'égouts, de compostage, d'équarrissage et d'industries alimentaires. Durant les années 80, on commence à développer des biofiltres pour l'enlèvement de diverses substances toxiques provenant des usines de produits chimiques, des fonderies et des imprimeries. Cette décennie voit apparaître plusieurs biofiltres aux États-Unis, qui jusque-là ignoraient pratiquement cette technologie. C'est depuis les années 90 que la biofiltration se répand un peu partout dans le monde avec des applications de plus en plus variées, comme pour l'enlèvement de composés aromatiques, d'alcools, d'aldéhydes, d'acides organiques et d'ammoniac gazeux.

Il existe plusieurs autres technologies servant à l'enlèvement d'ammoniac et d'autres gaz indésirables, tels que l'absorption physico-chimique (eg. charbon activé), l'incinération, l'oxydation catalytique, les techniques d'épuration (Joshi 2000). Cependant, la biofiltration possède plusieurs avantages ; une bonne efficacité, un faible coût d'opération, des besoins énergétiques faibles et demande peu d'entretien. De plus,

elle ne produit pratiquement de polluants secondaires, contrairement à l'absorption ou l'incinération par exemple. La biofiltration est donc une technologie de choix pour l'enlèvement du NH_3 , des COV, du H_2S et d'autres rejets gazeux. Cependant, cela demeure une technologie biologique, faisant intervenir des êtres vivants et dont nous sommes loin de saisir toutes les subtilités. Notre compréhension des biofiltres est surtout macroscopique et il reste beaucoup de travail à faire avant de bien comprendre le fonctionnement de ces engins biologiques.

1.3 Microbiologie du cycle de l'azote

On trouve dans la nature une variété de microorganismes participant activement au cycle de l'azote, assurant entre autres la disponibilité de cet élément pour les plantes par la nitrification et son retour à l'atmosphère sous forme d'azote gazeux (N_2) grâce à la dénitrification, tel qu'illustré à la figure 1.5. Cette façon typique de représenter le cycle est claire et concise mais ne tient pas compte des découvertes récentes en microbiologie environnementale, tel que nous verrons à la section 1.3.2.

Comme c'est le cas dans bien des domaines, le milieu industriel a su imiter la nature et mettre à profit les réactions du cycle de l'azote. On utilise depuis plusieurs années la nitrification et la dénitrification, souvent couplées l'une à l'autre, pour l'élimination de polluants azotés des eaux usées et effluents gazeux. Cela permet de transformer en deux étapes successives le NH_3 en N_2 . Ces deux processus ont été beaucoup étudiés, on les maîtrise relativement bien et les utilisons à notre avantage.

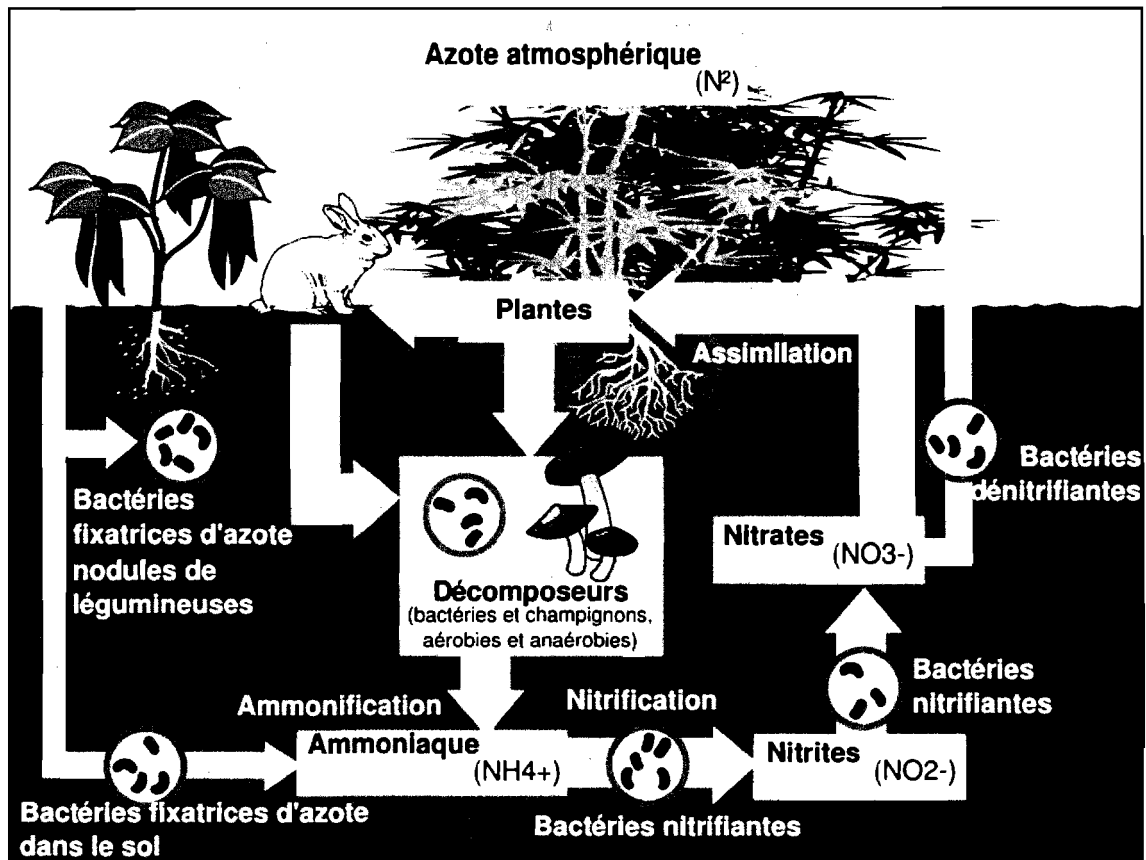


FIGURE 1.6 : Schématisation du cycle de l'Azote
(Source : <http://fr.wikipedia.org/>)

1.3.1 Caractéristiques des bactéries nitrifiantes

Les bactéries réalisant un processus de nitrification sont appelées bactéries nitrifiantes. Telles qu'introduites à la section 1.1.5, ces bactéries sont classées en deux catégories distinctes, soit les AOB et les NOB. Elles sont litho-autotrophes, ce qui signifie qu'elles tirent leur énergie de l'oxydation de composés inorganiques (l'ammoniac pour les AOB et le nitrite pour les NOB) et qu'elles synthétisent elles-mêmes leur carbone organique à partir du CO_2 atmosphérique. Ces microorganismes sont des bactéries Gram négatives de la famille des *Nitrobacteriaceae*, vivant en aérobie. Les représentantes les mieux connues et les plus étudiées des bactéries nitrifiantes sont sans doute *Nitrosomonas europaea*, qui oxyde l'ammoniac, et *Nitrobacter winogradskyi*, qui oxyde le nitrite (figure 1.7).

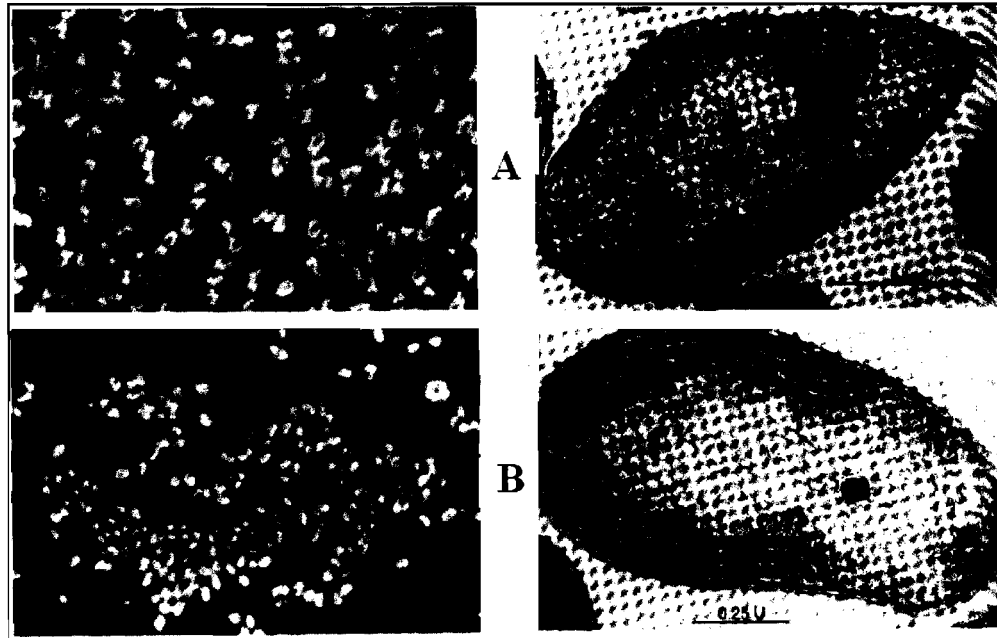


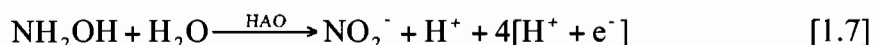
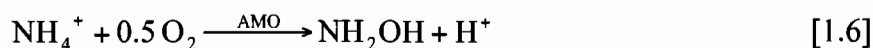
FIGURE 1.7 : Photographies de bactéries nitrifiantes en microscopie électronique
Nitrosomonas europaea en A et *Nitrobacter winogradskyi* en B
 (Source : Prescott *et al.* 2002)

Les bactéries nitrifiantes sont considérées comme fastidieuses car elles requièrent des conditions très spécifiques pour croître. Elles sont difficilement cultivables ce qui complique autant leur étude en laboratoire. Tout d'abord, la croissance des bactéries nitrifiantes est inhibée par la lumière : elles doivent être cultivées en chambre noire. Elles sont spécialement sensibles aux conditions de pH et de température. On cite souvent un pH de 7,8 et une température de 25°C comme valeurs optimales pour la nitrification (Hagopian et Riley, 1998). Le rendement de ces bactéries s'avère grandement altéré à des températures supérieures à 35°C et à peu près nul vers les 40°C. Les valeurs limites de pH sont quant à elles établies à 6,0 et 8,3. Un autre sérieux désavantage à la culture de ces bactéries est leur reproduction lente, causée par la faible efficacité énergétique de leurs voies métaboliques autotrophes. Dans les meilleures conditions, un temps de doublement de 7 à 8 heures peut être observé, mais on constate habituellement des temps de deux à trois fois plus lents (Hagopian et Riley 1998). Cette reproduction réduite rend les bactéries nitrifiantes vulnérables à la contamination par d'autres espèces, notamment par des bactéries hétérotrophes dont le métabolisme est beaucoup plus efficace (s'il y a suffisamment de carbone organique dans le milieu). De

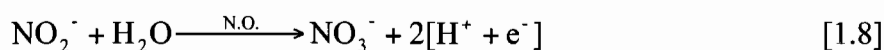
plus, la nitrification est inhibée par l'ammoniac libre (sous forme NH_3). Pour les AOB, cette inhibition se produit à partir de 10 à 150 mg/l de N-NH_3 , selon l'espèce et les conditions, alors que pour les NOB cela commence de 0.1 à 1.0 mg/l d'après les travaux d'Anthonisen *et al.* (1976). Toujours selon ces auteurs, l'acide nitrique libre (HNO_2) formé par les AOB est aussi inhibiteur de la nitrification à partir d'une concentration allant de 0.22 à 2.8 mg/l.

Les bactéries nitrifiantes possèdent aussi des avantages leur permettant d'être utilisées efficacement dans un procédé industriel tel qu'à NHCl . Tout d'abord, elles peuvent être maintenues dans un état de privation, c'est-à-dire à faible concentration de NH_3 et de NO_2^- (qui sont leur source d'énergie), avec un taux de respiration très faible et une activité anabolique indétectable. Pour les AOB, différentes voies énergétiques peuvent être utilisées pour garder la cellule en vie, selon l'espèce. Quant aux NOB, on a clairement identifié que le poly- β -hydroxybutyrate constituait la source de réserve énergétique lors de la privation (Hagopian et Riley 1998). Les cellules bactériennes peuvent donc rester en dormance et survivre lors de l'arrêt du procédé industriel, ce qui arrive fréquemment pour cause d'entretien ou de bris mécanique. Ces microorganismes nécessitent très peu d'oxygène, soit une concentration optimale à leur développement de 0,2 mg/l, et peuvent subsister dans des conditions encore plus pauvres (Hagopian et Riley 1998). Par surcroît, le métabolisme autotrophe de ces organismes implique un sérieux avantage dans un procédé de nitrification, du fait qu'il n'est presque pas nécessaire d'ajouter de source de carbone au milieu. Le CO_2 étant omniprésent dans l'air, cela simplifie grandement l'opération d'un biofiltre tel qu'à NHCl . Le fait qu'il y ait peu de carbone organique assimilable dans le support de tourbe diminue grandement le risque de contamination par des organismes hétérotrophes. Nous verrons cependant au chapitre 2 que ce n'est pas tout à fait le cas dans le biofiltre de NHCl .

Nous avons vu plus tôt les équations 1.4 et 1.5, qui étaient en fait des simplifications du métabolisme énergétique des bactéries nitrifiantes. L'équation 1.4, qui résume l'oxydation de l'ammoniac en nitrites, peut être divisée en deux étapes distinctes, présentées par les équations 1.6 et 1.7.



La réaction 1.6 est catalysée par l'ammoniaque mono-oxygénase (AMO), située dans la membrane cytoplasmique. Il y a production d'hydroxylamine (NH_2OH) qui est ensuite amené dans le périplasme et convertie en nitrite par la réaction 1.7, à l'aide de l'hydroxylamine oxydoréductase (HAO). Cette réaction produit des équivalents réducteurs, notés par $[\text{H}^+ + \text{e}^-]$, qui permettront la production de NADH_2 et éventuellement la formation d'ATP grâce à la chaîne de transport d'électrons et à l'ATPase. La production d'ions H^+ entraîne évidemment une acidification du milieu, qui requiert une neutralisation afin de garder le pH stable. À NHCl , la neutralisation est assurée par l'incorporation dans le milieu filtrant de carbonate de calcium (CaCO_3), qui sert aussi de source de carbone alternative à l'assimilation de gaz carbonique provenant de l'air injecté. Quant à la nitratisation, elle se déroule à peu près de la même manière qu'en 1.7, soit un transfert d'électron suivi d'une déshydrogénation par la nitrite oxydoréductase (NO) associée à la membrane.



Tel que mentionné précédemment, les équivalents réducteurs ainsi produits permettent de synthétiser du NADH_2 et de l'ATP via la chaîne de transport d'électrons, qui permettront la synthèse du carbone organique nécessaire à la cellule à partir du CO_2 atmosphérique. Plus de détails peuvent être trouvés dans l'article de revue très complet de Hagopian et Riley (1998), financé par l'industrie de l'aquaculture qui utilise depuis longtemps des biofiltres à bactéries nitrifiantes pour l'enlèvement des déchets azotés des poissons dans l'eau.

1.3.2 Anciens paradigmes et découvertes récentes

Nous venons de résumer de façon assez exhaustive les caractéristiques des bactéries nitrifiantes, connues et utilisées depuis longtemps en industrie. Tel que mentionné plus haut, l'autre processus microbiologique du cycle de l'azote utilisé de longue date en industrie est la dénitrification, soit la transformation du NO_3^- en N_2 gazeux en conditions d'anaérobie. Les microorganismes capables d'effectuer cette réaction sont hétérotrophes, c'est-à-dire qu'ils assimilent le carbone organique à la fois pour leurs besoins énergétiques et comme source de carbone pour la cellule. Une très grande variété de bactéries dénitrifiantes ont été répertoriées, dont des bactéries Gram positif, Gram négatif et des archéobactéries. Plus de détails sur le processus et les organismes en question peuvent être trouvés dans l'article de revue de Zumft (1997).

Ces deux processus microbiologiques, la nitrification et la dénitrification, étaient donc traditionnellement considérés comme des bases inébranlables dans le domaine des transformations d'azote. On prenait pour acquis que le seul moyen significativement efficace de transformer l'azote ammoniacal en azote gazeux était de procéder à une nitrification autotrophe en aérobie suivie d'une dénitrification hétérotrophe en anaérobie. Cela constituait ce qu'on peut qualifier de paradigme, sur lequel on se base pour avancer les recherches dans le domaine et appliquer nos connaissances en industrie. Des centaines de réacteurs biologiques séquentiels fonctionnent d'ailleurs de cette façon, avec des successions d'étapes d'aération et d'anaérobie, avec d'excellentes efficacités. Bien sûr, d'autres réactions microbiologiques avaient déjà fait objet d'études, telles que l'oxydation de l'ammoniac en anaérobie et la dénitrification en aérobie (Kim *et al.* 2005, Meiberg *et al.* 1980). Ces processus étaient cependant considérés comme des exceptions avant les années 2000, quantitativement négligeables dans les écosystèmes naturels et dans les procédés industriels. Si nous prenons du bioréacteur de NH_4Cl , où les concentrations d'oxygène sont importantes et où on trouve peu de carbone organique assimilable, la nitrification autotrophe était considérée comme le principal, voir le seul, processus microbiologique de transformation d'azote.

Toutefois, plusieurs découvertes se sont accumulées depuis la fin des années 1990, rendant les études sur les transformations d'azote dites « anormales » de plus en plus crédibles. Certaines portaient sur des procédés microbiologiques en industrie, d'autres sur la microflore d'écosystèmes naturels, plusieurs relatant la découverte de réactions microbiologiques qu'on croyait jadis impossibles. On a même trouvé que certaines jouaient des rôles majeurs dans leur milieu, dont l'oxydation anaérobie de l'ammoniac (anammox) qui est responsable de pas moins de 50% du retour à l'atmosphère de l'azote fixé des océans (Dalsgaard *et al.* 2005). Les nouvelles découvertes, énumérées ci-bas, ont donc abouti au bouleversement complet du cycle de l'azote :

1. Nitrification hétérotrophe
(Stevens *et al.* 2002, Papen *et al.* 1998, Yan *et al.* 2006)
2. Dénitrification en aérobie
(Kim *et al.* 2005, Meiberg *et al.* 1980)
3. Nitrification-dénitrification simultanées
(Kim *et al.* 2005)
4. Réaction anammox
(Mulder *et al.* 1995, Jetten *et al.* 1998, Dalsgaard *et al.* 2005)

Ces nouvelles découvertes témoignent de l'immense diversité microbienne sur notre planète. Il semble maintenant que, peu importe les conditions, il existe des microorganismes capable d'effectuer de nombreux types de transformations d'azote. Ce projet de recherche a donc été mené en tenant compte de ces nouvelles découvertes. Nous avons abandonné les balises d'autrefois qui, dans certains cas, pouvaient limiter la compréhension des phénomènes étudiés et le progrès scientifique. Après tout c'est de cette façon que la science a toujours évolué : par la succession de paradigmes qui doivent périodiquement être remis en question.

1.4 Problématique et objectifs

Le biofiltre est entré en fonction à l'automne 2003. Initialement, il a été conçu pour éliminer environ $7 \text{ g N-NH}_3/\text{m}^3$ milieu filtrant/h, ce qui équivaut à 90% d'efficacité pour une concentration en ammoniac sous le biofiltre de 150 ppmv. On évaluait cette concentration comme la quantité maximale d'ammoniac qu'il y aurait sous le biofiltre lors d'une désactivation de 10 tonnes de SPEFs par jour. En effet, les tests préliminaires du projet pilote, réalisés avec une cinquantaine de blocs de SPEFs sélectionnés au hasard, avaient montré un tel dégagement d'ammoniac ; le bioréacteur a été conçu en fonction de ces résultats. Les autres paramètres de fonctionnement du biofiltre, fixés selon les caractéristiques connues des bactéries nitrifiantes (voir section 1.3.1), étaient un pH entre 6,0 – 8,0 et une température entre 20 – 30°C. Le maintien du pH devait être assuré par les pastilles de calcite incluses dans le milieu filtrant et la température maintenue en hiver par chauffage de l'air injecté. À l'intérieur de ces conditions d'opération, le CRIQ garantissait une bonne efficacité du biofiltre et des bactéries nitrifiantes y habitant.

Les employés de NHCI ont cependant eu une surprise de taille lors du démarrage du procédé : les blocs de SPEFs dégageaient jusqu'à trois fois plus d'ammoniac que ce qui fût calculé pendant le projet pilote ! Était-ce du à un échantillonnage préliminaire des blocs de SPEFs non-représentatif ? À un appareil de mesure défectueux ? Aux conditions du réacteur pilote trop dissemblables au bioréacteur à grande échelle ? La raison de cette disparité reste toujours inconnue. Quoiqu'il en soit, l'alimentation en SPEFs pendant les premiers mois du procédé ne pouvait être que de 3 à 4 t par jour plutôt que 10 t, afin d'assurer la bonne efficacité du biofiltre et le respect des normes environnementales. Ce rythme de désactivation n'était pas même suffisant pour éliminer les déchets engendrés par la production journalière de l'usine, alors que des milliers de tonnes étaient déjà entassées dans les entrepôts !

Après quelques semaines de rodage, l'efficacité du biofiltre s'améliora légèrement. On entreprit donc d'augmenter graduellement l'alimentation du bioréacteur, en espérant

que le biofiltre demeure fonctionnel et qu'une biomasse efficace pour l'enlèvement de hautes concentrations d'ammoniac s'y adapte. C'est en effet ce qui se produit, si bien que depuis 2005 le réacteur fonctionne à plein régime, soit environ 10 – 12 tonnes de SPEFs par jour pour une concentration d'ammoniac à l'entrée du biofiltre de 150 – 400 ppm, avec une efficacité moyenne de 90 % ! C'est jusqu'à 20 g N-NH₃/m³ milieu filtrant/h qui est traité, soit près de trois fois les paramètres initiaux d'opération. Cette efficacité est d'autant plus surprenante que les conditions à l'intérieur du biofiltre sont tout à fait défavorables au développement des bactéries nitrifiantes : la concentration en ammoniac libre (100 – 200 mg/l) et le pH (8,0 – 9,7) sont beaucoup trop élevés. De plus, la température du biofiltre atteint des valeurs allant jusqu'à 42°C pendant les semaines chaudes d'été, ce qui est bien supérieur à la température limite tolérable pour ces micro-organismes. Ces conditions ne semblent pas affecter la très grande efficacité du bioréacteur. De plus, d'autres mesures effectuées en laboratoire laissent croire à une faible activité des bactéries nitrifiantes.

Ainsi, nous avons tout d'abord effectué des mesures du potentiel de nitrification des bactéries du biofiltre par une méthode respirométrique (Gilbert 2002). Ces analyses ont été effectuées par le CRIQ, qui possède une expertise particulière dans le domaine et avec qui nous avons collaboré durant ce projet de recherche. Leur méthode consiste à inoculer un échantillon de milieu filtrant à un milieu liquide dont les conditions sont idéales pour la nitrification. On mesure dans un premier temps l'oxygène consommé par tous les micro-organismes du milieu, pour obtenir une courbe de concentration d'oxygène en fonction du temps. On ajoute ensuite un inhibiteur de la nitrification, l'allylthiourea, avant de mesurer à nouveau la consommation d'oxygène en fonction du temps. La différence de pente entre les deux courbes ainsi obtenues nous donne la consommation d'oxygène spécifique des organismes nitrifiants, d'où on peut calculer une nitrification théorique d'ammoniac. Différentes mesures ont donc été effectuées de cette manière lors de quatre séances d'échantillonnage, réparties entre mai 2006 et janvier 2007. Bien que quelques échantillons aient menés à des résultats positifs, la plupart étaient très faibles, étant souvent en-deçà de la limite de détection de la technique de mesure (Annexe C).

Parallèlement, nous avons effectué des tests au laboratoire de l'UQTR, avec les mêmes échantillons que ceux utilisés par le CRIQ. Nous avons effectué l'évaluation qualitative du potentiel de nitrification en utilisant un milieu inorganique procurant les meilleures conditions pour les bactéries nitrifiantes (Yani et al. 2000, Engel et Alexander 1958). Ce milieu liquide, auquel on ajoute un indicateur de pH, tire profit du fait que la nitrification est accompagnée d'une production d'ions H^+ et donc d'une acidification du milieu, tel que décrit par l'équation 1.4. Il suffit donc d'y inoculer une certaine quantité de milieu filtrant, de placer le tout dans des conditions propices aux bactéries nitrifiantes (30°C, en aérobie, à la noirceur) et de vérifier périodiquement si on observe une baisse de pH (accompagnée par un changement de couleur). Ces tests ont corroborés les résultats obtenus par respirométrie, c'est-à-dire que les échantillons montrant une activité respirométrique significative menaient tous à une baisse de pH. Cependant, comme dans le cas des mesures du CRIQ, la plupart des tests se sont montrés négatifs (Annexe D).

Plusieurs indices amènent donc à croire que les bactéries nitrifiantes sont faiblement actives dans le biofiltre de $NHCl$. Malgré tout, cette technologie fonctionne nettement mieux qu'escompté, avec un taux d'enlèvement d'ammoniac très élevé. Un constat clair se dégage donc : nous ne connaissons pas la façon dont le biofiltre fonctionne. Le procédé est efficace jusqu'à maintenant, mais pour combien de temps ? Il nous est impossible de prédire l'évolution d'un système dont on ignore les processus de base. Il serait impératif de connaître les paramètres à contrôler pour assurer le bon fonctionnement de ce procédé. C'est suite à ce constat et ces interrogations, dans une approche proactive visant une meilleure compréhension des mécanismes impliqués, que ce projet de recherche et développement a été entamé. Les objectifs généraux étaient les suivants :

- Caractériser les conditions d'utilisation du biofiltre à haute concentration en ammoniac;

- étudier l'aspect microbiologique du biofiltre et tester expérimentalement d'autres souches bactériennes dans le but d'en améliorer l'efficacité;
- développer une expertise dans le domaine des bactéries nitrifiantes à l'UQTR et à NHCI.

Nous désirions donc, grâce à ce projet de recherche, mieux comprendre la microbiologie du biofiltre et se donner des outils pour contrôler son efficacité de façon autonome. Nos objectifs de départ étaient larges, ce qui nous laissait beaucoup de latitude quand aux méthodologies utilisées. Après une revue de littérature, l'évaluation des avenues pertinentes et l'établissement de nos hypothèses de travail, le projet a abouti à l'exploration de deux volets distincts que nous avons étudiés de façon approfondie. Ces volets constituent le corps de ce mémoire de maîtrise et font l'objet de deux articles scientifiques présentés plus loin :

1. La caractérisation de la biomasse hétérotrophe du biofiltre de NHCI;
2. les études d'enlèvement d'ammoniac dans la phase liquide du bioréacteur de NHCI par *Vibrio alginolyticus*.

1.4.1 Objectifs spécifiques du premier volet

Tel que nous venons de mentionner, nous avons plusieurs raisons de soupçonner que les bactéries nitrifiantes n'étaient pas très actives dans le biofiltre de NHCI ; les conditions défavorables à leur croissance (pH, température, ammoniac libre) ainsi que les mesures du potentiel de nitrification (respirométrie, test de pH) allaient dans ce sens. L'efficacité du biofiltre demeurerait tout de même beaucoup plus élevée qu'escomptée. Ce volet expérimental avait donc comme objectif d'étudier la composition microbiologique du biofiltre, pour mieux comprendre son fonctionnement et ainsi pouvoir mieux contrôler son efficacité.

Nous avons émis l'hypothèse suivante, basée sur les nouvelles découvertes dans le cycle de l'azote : y aurait-il des bactéries autres que les bactéries nitrifiantes autotrophes impliquées dans le processus d'enlèvement d'ammoniac du biofiltre ? C'est la question à laquelle nous tentons de répondre à l'intérieur de ce volet expérimental. Il est cependant impossible de cibler toutes les bactéries du biofiltre à l'intérieur de cette étude. Ils y sont probablement au nombre de centaines, voir de milliers d'espèces différentes. Nous avons donc concentré nos efforts sur les bactéries hétérotrophes facilement cultivables, qui contiennent plusieurs genres connus pour jouer des rôles importants lors de la transformation d'azote dans des milieux naturels ou industriels, tel que vu à la section 1.3.2. De plus, le choix de ces bactéries simplifie grandement les manipulations, puisqu'elles sont facilement dénombrables et cultivables en laboratoire. C'est donc avec ces bactéries que nous avons décidé de travailler malgré le fait que le biofiltre contienne peu de carbone organique assimilable, justement pour limiter leur prolifération. Voici de façon plus concrète ce que nous proposons de faire :

- Échantillonner le biofiltre pour déterminer si un nombre significatif de bactéries hétérotrophes facilement cultivables y sont établies. Si tel est le cas, les dénombrer en laboratoire et isoler les spécimens en culture pure;
- Identifier de façon préliminaire les bactéries trouvées, par réaction PCR et séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S;
- Déterminer leur capacité à transformer différentes formes d'azote en laboratoire pour évaluer la possibilité qu'elles participent aux réactions dans le biofiltre.

Ces expérimentations ne permettent ni de mesurer quantitativement le rôle des bactéries hétérotrophes du biofiltre ni de déterminer l'importance relative d'une espèce par rapport à l'autre. Cela demanderait des recherches beaucoup plus approfondies sur une longue période de temps et nécessiterait beaucoup de ressources. Cela constitue

néanmoins une première approche permettant d'évaluer et d'apprécier la complexité du système avec lequel nous travaillons.

1.4.2 Objectifs spécifiques du second volet

Le fait que les bactéries nitrifiantes (sur lesquelles la conception du biofiltre était basée) ne soient pas très actives dans le milieu filtrant nous laisse en position vulnérable, puisque nous ignorons les paramètres garantissant l'efficacité du procédé. Il est vrai que le biofiltre fonctionne bien, mais pour combien de temps ? N'étant pas en mesure de prévoir une éventuelle chute d'efficacité du procédé, nous avons adopté une attitude proactive afin de ne pas être pris au dépourvu si un tel cas se produisait. Nous avons donc voulu étudier une solution alternative qui, sans nécessairement remplacer le biofiltre, pourrait être utilisée en association avec celui-ci pour augmenter l'efficacité globale du procédé. Les objectifs de ce volet expérimental étaient donc :

- Explorer les possibilités d'améliorer l'efficacité du bioréacteur, pour diminuer les rejets d'azote à l'environnement et accélérer le traitement des SPEFs;
- Développer une alternative dans le cas d'une éventuelle chute d'efficacité du biofiltre.

Nous avons exploré la possibilité d'enlèvement d'ammoniac par une bactérie dans la phase liquide du bioréacteur, en dessous du biofiltre (voir figure 1.4). Cela permettrait de diminuer la quantité d'ammoniac à l'entrée du biofiltre sans en affecter le fonctionnement et tout en diminuant les rejets azotés dans la phase liquide. Cependant, les caractéristiques de cette solution aqueuse de SPEFs sont loin d'être propices à l'établissement de microorganismes ! Il s'agit d'un milieu extrême, salin et très alcalin, d'apparence inhabité (aucune colonie formée sur gélose TSA). Cela requiert donc l'utilisation d'une bactérie costaute, capable de résister à ces conditions. Le tableau 1.1 présente les principaux paramètres chimiques et physiques du liquide, mesurés par les sondes sur places et par le laboratoire analytique de NHCI.

TABEAU 1.1 : Caractéristiques de la solution de SPEFs

		Moyenne	Écart-
		type	
T	(°C)	33°C	7°C
pH		9,7	0,2
Cl	(mg l ⁻¹)	17 000	6 000
Ca	(mg l ⁻¹)	3 300	1 200
Na	(mg l ⁻¹)	4 400	1 700
Mg	(mg l ⁻¹)	1 300	400
K	(mg l ⁻¹)	400	150
P	(mg l ⁻¹)	< 1,5	-
N-NH ₃	(mg l ⁻¹)	260	150
NTK*	(mg l ⁻¹)	290	130
Salinité	(mg l ⁻¹)	26 000	8 000

*NTK : Azote total dosé par méthode de Kjeldahl. N'inclus pas les NO₂⁻ et NO₃⁻.

On remarque que les écart-types des différentes mesures sont plutôt élevés. Cela s'explique par les variations de la composition chimique entre les blocs de SPEFs et du taux d'alimentation du bioréacteur. Tout cela influe sur les caractéristiques du liquide. Les paramètres les plus contraignants pour les microorganismes sont le pH très alcalin (9,7), la salinité élevée (26 000 mg/l ou 2,6 %) et la forte concentration en ammoniac (260 mg N-NH₃/l).

Notre étude de la littérature nous a permis de découvrir une bactérie très intéressante nommée *Vibrio alginolyticus*, une gamma-protéobactérie Gram négatif, dont une photographie en microscopie électronique est présentée à la figure 1.8.

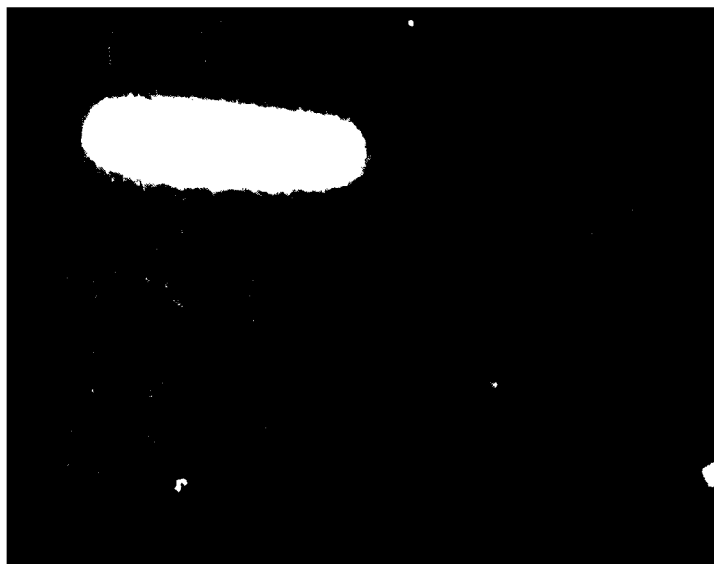


FIGURE 1.8 : *V. alginolyticus* en microscopie électronique
(source : Prescott et al. 2002)

V. alginolyticus a déjà été testée dans un biofiltre pilote pour l'enlèvement de l'ammoniac gazeux d'un effluent synthétique, en milieu salin (Kim et Shoda 2002). L'équipe de chercheurs japonais avait obtenu des résultats très prometteurs, avec un taux d'enlèvement d'ammoniac de 16 g N-NH₃/kg milieu filtrant/jour, sous conditions non-stériles. Cette bactérie provient de l'eau de mer : elle est donc halophile. C'est l'ajout de sel dans le milieu qui lui permettait d'avoir le dessus sur ses compétiteurs et de proliférer de façon massive dans le biofiltre pilote. *V. alginolyticus* devrait être en mesure de tolérer la salinité de la solution de SPEFs, qui est quelque peu inférieure à celle de l'eau de mer (2,6 % vs 3,5 %) (Copin-Montégut 1996). L'eau de mer est aussi alcaline, quoique son pH de 8,0 soit bien en-deçà de l'alcalinité du bioréacteur. Nous avons donc décidé de tester le potentiel de cette bactérie à participer au procédé d'enlèvement d'ammoniac à NCHI. Plus spécifiquement, nous proposons de :

- Tester en laboratoire la capacité de *V. alginolyticus* à survivre dans la solution de SPEFs de NHCl, en y ajoutant les nutriments nécessaires à sa prolifération;
- Reproduire à échelle réduite les conditions du bioréacteur en laboratoire et mesurer la capacité d'enlèvement d'ammoniac de *V. alginolyticus*.

CHAPITRE II

ARTICLE SCIENTIFIQUE 1

2.1 Characterization of heterotrophic bacteria in an industrial organic biofilter with removal of high load ammonia gas

Jean-François Vermette¹, Jean Laperrière², Marc Sirois^{1§}

¹ Université du Québec à Trois-Rivières, département de chimie-biologie, 3351 boul. des Forges, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9H 5H7.

² Norsk Hydro Canada Inc., 7000 boul. Raoul-Duchesne, Bécancour Québec, Canada, G0X 1B0.

§Corresponding author. Tel: (819) 376-5011 ext. 3999 Fax: (819) 376-5084.

Email addresses:

JFV: jean-francois.vermette@uqtr.ca

JL: jean.laperriere@hydro.com

MS: marc.sirois@uqtr.ca

(Voir instructions aux auteurs à l'Annexe A)

2.2 Abstract

2.2.1 Background

Industrial wastes that contain ammonia are treated by biofilters since many years, mostly by autotrophic nitrifying bacteria. In this work, we studied the biofilter of Norsk Hydro Canada Inc., a magnesium plant located in Bécancour QC, Canada. It consists in a fixed peat bed seeded with nitrifying sludge that removes high load of ammonia gas efficiently (up to 20 g N-NH₃/m³ filter's media/h). Since the conditions in the media are unfavourable for nitrifying bacteria, we studied the heterotrophic biomass that is established in the biofilter to determine if it could play a significant role for ammonia removal.

2.2.2 Results

Of four sampling campaigns, we found about 10⁷ cfu/g filter's media of heterotrophic bacteria on TSA plates. Thirteen strains were isolated in pure cultures, identified with 16S rRNA gene sequencing and tested for nitrogen transformation in organic media. We found that most of the strains were *Bacillus* species and were able to consume nitrites or nitrates.

2.2.3 Conclusions

Heterotrophic bacteria might play an important role for ammonia removal in biofilters with organic media. A complex network between the different bacteria of a consortium where different forms of nitrogen are produced and consumed should be considered, instead of the autotrophic nitrification as only responsible for ammonia removal.

2.3 Background

Ammonia removal is done efficiently by biofilters in many industries, including the treatment of urban wastewaters [1], animal wastes industries [2, 3], aquaculture [4] and so on. The most studied microbiological process that leads to ammonia removal, either in natural environments or in industrial processes, is the nitrification by autotrophic bacteria which oxidize ammonia to nitrate by two subsequent reactions:



Reaction 1 is performed by ammonia oxidizing bacteria (AOB), such as *Nitrosomonas europaea*, and reaction 2 is performed by nitrite oxidizing bacteria (NOB), such as *Nitrobacter winogradskyi*. These bacteria are effective under specified conditions of pH (6.0-8.3) and temperature (10-35°C) [5]. When these conditions are not satisfied, nitrification is strongly inhibited. Moreover, inhibition by free ammonia begins to occur at concentrations from 10 to 150 mg/l for AOB and from 0.1 to 1 mg/l for NOB [6].

Norsk Hydro Canada Inc., a magnesium plant located in Bécancour QC, Canada, is using such a biofilter to remove the ammonia gas produced during the deactivation of an industrial waste, called the Foundry and Electrolysis By-Products (FEBPs). This biofilter, known as BIOSORTM, was developed by the Centre de Recherche Industriel du Québec (CRIQ). Figure 2.1 shows the process of FEBPs deactivation at NHCl.

The biofilter, implanted in November 2003, was designed to oxidize up to 7 g N-NH₃/m³ filter's media/h, at pH 6.0-8.0 and temperature from 20-30°C, as described by Turgeon et al. [7]. It is composed of about 4 feet of peat media with woodchips and bark, which

contains little assimilable organic carbon so heterotrophic bacteria would not grow significantly and overcome the nitrifying community. Calcite granules (CaCO_3) are included within the media to satisfy the carbon requirements of the autotrophic nitrifying bacteria and to neutralize the acidity produced by reaction 1.

However, the deactivation of the FEBPs at NHCI is producing much more ammonia gas than expected; from 150 to 400 ppmv at the inlet of the biofilter, for a loading rate of 10 to 20 g $\text{N-NH}_3/\text{m}^3$ filter's media/h. Since 2005, after the initial break in of the process, the bioreactor works at full capacity with incredibly high efficiency (85-95% ammonia removal). This effectiveness overcome the designed parameters and is even more surprising considering that the biofilter works outside of the operating parameters, initially defined in regards of the known characteristics of AOB and NOB. Free ammonia concentration (100-200 mg/l) and pH (8.0-9.5) are much too high in the media. Moreover, the temperature of the biofilter reaches up to 40-42°C during the hottest period of summer. These conditions do not seem to affect the great ammonia removal efficiency. Other evidences lead us to think that nitrifying activity is poor in the biofilter. First, concentrations of the products of nitrification are very low in the media : lesser than 15 mg $\text{N-NO}_2/\text{kg}$ filter's media and 12 mg $\text{N-NO}_3/\text{kg}$ filter's media in January 2007, as measured by the CRIQ. The activity of nitrifying bacteria was also followed with the inorganic medium of Engel and Alexander [8, 9], in which a pH drop and a color change are induced when nitrification occurs. These tests led to good results with the media sample of May 2006, but very poor to negative results from June 2006 to January 2007 (data not shown). Finally several respirometric tests [10] were conducted at the CRIQ in 2006 and 2007, for quantification of the activity of nitrifying bacteria.

The results were low, near of the detection limit of the method in most of the cases (data not shown).

These evidences, combined with the very good efficiency of the biofilter of NHCl, led us to hypothesize that other kinds of bacteria in the biofilter could play an important role for ammonia removal. Despite the low accessibility of organic carbon in the media, we proceeded to bacterial counts of easily cultivable heterotrophic bacteria, followed by isolation on TSA plates and identification by sequencing of 16S rRNA gene. We also performed basic biochemical tests to investigate the ability of those bacteria to transform nitrogen.

2.4 Results

2.4.1 Bacterial counts

The numbers of colonies on TSA plates from the different sampling campaigns are presented in table 2.1. Each result is the average of the counts of four samples: a composite of the biofilter's surface and three samples from a sampling cage within the biofilter. The TSA cultures from the first sampling campaign were made with lower dilution ratios, because we initially underestimated the number of heterotrophic bacteria in the biofilter. The other counts resulted in an average of 10^7 cfu/g filter's media. This value is considered high, considering the low accessibility of organic carbon in the biofilter.

2.4.2 Biochemical tests for nitrogen transformation

The colonies isolated from August 11th 2006 were identified HA series (Heterotrophs

August) while colonies isolated from January 23rd 2007 were identified HJ series (Heterotrophs January). At 48 hours after inoculation, all of the 13 isolated strains grew well in the three liquid media; PMSA-NO₂, PMSA-NO₃ and PMSA-NH₄. Table 2.2 presents the nitrogen transformations observed in our test tubes 16 days post-inoculation.

From the 13 strains, 8 have shown to be consuming nitrates. For four of them, nitrites were produced in the process while neither nitrites nor gas was detected for the others. In the latter case, nitrates may have been assimilated by the bacteria for production of amino acids and cellular compounds. Another hypothesis would be the production of ammonium from nitrates, since ammonium was not measured during the tests. We observed consumption of nitrites by three bacterial strains. For two of them, gas production was detected in Durham tubes while no products could be detected for the other one. Once again, we assume that nitrites were either assimilated for the nitrogen needs of the bacteria or reduced in ammonium ions.

2.4.3 Bacterial identification by 16S rRNA gene sequencing

PCR reactions followed by sequencing were conducted with the 13 isolated bacterial strains. The simple procedure that we used resulted in 8 proper sequences for BLAST [11] identification out of the 13 isolates. Table 2.3 presents the results obtained. Most of the strains were identified as *Bacillus* species, which are sporulating Gram positive eubacteria. All of the identified strains are known to tolerate high salinity and alkalinity [12-18], conditions that are found in the biofilter, and some are related to strains degrading lignocellulosic compounds and sub-products [12, 14, 15, 16].

2.5 Discussion

Our results show that an important heterotrophic biomass is established in the biofilter, with 10^7 cfu/g filter's media. This number only includes bacteria that grow easily on TSA plates. The fastidious bacteria, which require specific nutrients or the presence of other micro-organisms to grow, were not taken into account. Nevertheless, the easily cultivable heterotrophic bacteria probably overcome the number of autotrophic nitrifiers in the biofilter, for which the number was aimed to be at 10^4 - 10^6 MPN/g filter's media at the beginning of the process [7]. The number of nitrifiers is probably even lower than these targeted values because of the unfavourable conditions in the biofilter. Moreover, 9 of the 13 isolated strains have shown to metabolize efficiently NO_2^- or NO_3^- , which are sub-products of nitrification. In two cases, gas was detected from the consumption of NO_2^- . It is most likely N_2 or N_2O gas produced from aerobic denitrification [19]. It must be kept in mind that we cannot conclude if these reactions occur in the biofilter or not, because the conditions are far from those in the PMSA test tubes. However, it permits to realize the great potential of our bacterial strains for nitrogen transformation. Therefore, we can envisage the possibility of a complex consortium between heterotrophic and autotrophic bacteria within the biofilter's media, where micro-organisms are using the sub-products of others to grow. These complex interactions would result in consumption of the different forms of nitrogen in the medium, leading to high removal of ammonia gas.

Since October 2006, the technical staff of NHCI noticed a gradual increase of the differential pressure throughout the biofilter, revealing degradation and compaction of the media. This is most likely caused by the heterotrophic bacteria, which are using the

peat medium for carbon needs. Most of them are probably specialized organisms able to assimilate lignocellulose compounds from the media. They must have colonized the biofilter gradually, carried from the environment by the wind and by people working on the process. The organic carbon that is synthesized and discharged by autotrophic bacteria may also represent an important supply to support heterotrophic growth.

An organic biofilter such as the one of NHCl can be an important habitat for a lot of bacterial species. Some studies have elaborated complex models for multi-species interactions in biofiltration processes [20], but we are far from a precise understanding and quantification of the various biochemical reactions occurring in such a system. Furthermore, the characteristics of each process are varying with the local conditions (composition of the influent, meteorological conditions, time of the year, microflora of the geographical region, etc.). Nevertheless, this study was the first step toward showing that organic biofilters for ammonia removal can be more complex than just autotrophic nitrification. More accurate studies could follow this one, including the monitoring of each bacterial strain individually and quantification of their contribution to ammonia removal.

2.6 Conclusions

This study aimed to preliminarily investigate the role of heterotrophic bacteria in the biofilter of NHCl. We found 10^7 cfu/g filter's media of heterotrophic bacteria on TSA plates. The isolated strains were identified mostly as *Bacillus* strains, by PCR amplification of the 16S RNA gene followed by sequencing. These bacteria are degrading the filter's media to obtain their source of carbon, which lead to compaction.

Therefore the biofilter will have to be changed soon. The nitrogen transformation experiments showed that the heterotrophic bacteria probably have an important role in the biofilter. Complex interactions between the numerous bacteria of a consortium are most likely occurring. Therefore this study leads to reconsideration of the paradigm of autotrophic nitrification as the sole phenomenon for ammonia removal in organic bed biofilters.

2.7 Methods

2.7.1 Peat sampling

We performed four sampling campaigns of the biofilter between August 2006 and January 2007, collecting four different samples each time. We first made a composite of the surface of the biofilter, consisting in a mix of three samples taken at random locations at about 1' deep in the filter. We also took three samples from a sampling cage that is installed in the biofilter. This apparatus consists in a removable acrylic box that gives access to the lower layers of the biofilter. Samples were taken at 1', 2' and 3' deep in the cage. About 100 g of media was collected by hands, using new medical gloves for each sample. The media was carried to the laboratory in plastic bags at 4°C and treated within two hours.

2.7.2 Bacterial counts and isolation

We elaborated a simple procedure to count and isolate the easily cultivable heterotrophic bacteria from the biofilter's media. We measured 5 g of media in a sterile 50 ml test tube and added 25 ml of TSB medium 50% (diluted with ddH₂O to minimize emulsion). Samples were agitated vigorously for 30 seconds to suspend the cells and settled for 2 minutes. Serial dilutions were prepared with the supernatant in 10 ml test tubes. Aliquots of 50 µl from each tube were spread on TSA plates, a rich medium on which a wide variety of heterotrophic bacteria is able to grow. This procedure permitted to evaluate the number of colonies formed from a certain amount of filter's media. For the samples of August 11th 2006 and January 23rd 2007, we selected and isolated the colonies that were present in most of the four samples of the biofilter, to work only with the most numerous heterotrophic bacteria and, most likely, those that play an important role in the biofilter. These colonies were inoculated to successive TSA plates to obtain pure cultures. We isolated seven different strains from August 11th 2006 and six strains from January 23rd 2007. They were kept on TSA plates and transferred on fresh medium every 14 days. TSB and TSA culture media were obtained from Difco Company (Lawrence KS, USA).

2.7.3 Biochemical tests for nitrogen transformation

To assess the ability of our bacterial strains to assimilate and transform different forms of nitrogen, we conceived three liquid media similar to the one used by Papen and von Berg for MPN estimation of heterotrophic nitrifiers [21]. The first medium was PMSA-NO₃ (Peptone-meat extract softagar), containing 9 g/l of nitrate broth and 1 g/l agar. PMSA-NO₂ contained 8 g/l nutrient broth, 1 g/l agar and 1 g/l NaNO₂. PMSA-NH₄

contained 8 g/l nutrient broth, 1 g/l agar and 1 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The nitrate broth, nutrient broth and agar were obtained from Difco Company and chemical products were from Sigma-Aldrich (St-Louis MO, USA). We prepared 10 ml batches of the PMSA media in 15 ml test tubes containing a Durham tube to detect gas production. They were autoclaved for 20 minutes at 121°C before the addition of the NaNO_2 and the $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sterilized beforehand with 0,45 μl syringe filters (Nalgene labware, Rochester NY, USA). One colony of each strain was inoculated to a tube of each medium. They were kept aerobically at 37°C for 16 days, with a daily agitation of 10 seconds using a vortex mixer to ensure that sufficient oxygen was dissolved in the media. Bacterial proliferation and gas production in the tubes were evaluated visually. After 16 days we qualitatively tested for the presence of nitrites with sulfanilic acid and aromatic amines, using the test kit of Biomérieux (Ville Saint-Laurent QC, Canada), and in the case where nitrites were not detected, we tested for nitrates by adding zinc.

2.7.4 Bacterial identification by 16S rRNA gene sequencing

To identify the 13 isolated bacterial strains, we performed a PCR amplification of the 16S rRNA gene followed by sequencing. To extract the bacterial DNA, a 100 μl suspension of the cells was frozen at -80°C for 15 min and then boiled for 10 minutes. These steps were carried out two times. We used the protocol of Yan et al. [22] for PCR amplification with the universal primers fD1 mod and rP2 of Kotilainen et al. [23]. The reaction was performed by 40 cycles of the following parameters: 30 s at 94°C , 30 s at 40°C , 120 s at 72°C . These steps were preceded by a hot start of 10 min at 95°C , prior to the addition of the Taq polymerase, and followed by a final extension step of 7 min at 72°C . The amplification products were checked by 0,8% agarose gel electrophoresis

and staining with SYBR safe (Invitrogen, Burlington ON, Canada) for DNA staining.

The PCR products were sent for sequencing at the Nucleic Acids Analysis Laboratory of the Laval University (Québec QC, Canada). The sequences hence obtained were analysed with the BLAST tool of the NCBI [11].

2.8 Authors' contributions

JFV realised all the experiments, participated to analysis and interpretation of data and drafted the manuscript.

JL provided technical support with the FEBPs treatment process, participated to the interpretation of data and to the revision of the manuscript.

MS supervised the microbiological experiments, participated to the interpretation of data and to the revision of the manuscript.

2.9 Acknowledgements

Jean-François Vermette was supported by an Industrial Postgraduate Scholarships of the National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the laboratory experiments were founded by the NHCI environmental services. We are also grateful to all the employees of NHCI who worked on the FEBPs treatment process.

2.10 References

1. Hu Z, Gagnon GA: **Impact of filter media on the performance of full-scale recirculating biofilters for treating multi-residential wastewater.** *Water research* 2006, **40**:1474-1480.
2. Garzón-Zúñiga M., Lessard P., Aubry G., Buelna G.: **Nitrogen elimination mechanisms in an organic media aerated biofilter treating pig manure.** *Environmental Technology* 2005, **26**:361-372.
3. Friedrich U, Van Langenhove H, Altendorf K, Lipski A: **Microbial community and physicochemical analysis of an industrial waste gas biofilter and design of 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes.** *Environ Microbiol* 2003, **5**:183-201.
4. Yang L, Chou LS, Shieh WK: **Biofilter treatment of aquaculture water for reuse applications.** *Water Research* 2001, **35**:3097-3108.
5. Hagopian DS, Riley JG: **A closer look at the bacteriology of nitrification.** *Aquacultural Engineering* 1998, **18**:223-244.
6. Anthonisen AC, Loehr RC, Prakasam TBS, Srinath EG: **Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid.** *Journal of the Water Pollution Control Federation* 1976, **48**:835-852.
7. Turgeon N, Buelna G, Le Bihan Y, Ouellet B, Grenon N, Bélanger D: **Treatment of industrial air emissions highly contaminated with ammonia using biofiltration on an organic bed case study : Norsk Hydro Canada Inc.** *In Proceedings of the USC-CSC-TRG Conference on Biofiltration: 20-22 October 2004, Redondo Beach.*

8. Yani M, Hirai M, Shoda M: **Enhancement of ammonia removal in peat biofilter seeded with enriched nitrifying bacteria.** *Environmental Technology* 2000, **21**:1199-1204.
9. Engel MS, Alexander M: **Growth and autotrophic metabolism of *Nitrosomonas europaea*.** *J Bacteriol* 1958, **76**:217-222.
10. Gilbert Y: **Mise au point d'une méthode respirométrique pour évaluer l'activité microbiologique d'un biofiltre à base de tourbe.** *MSc thesis*. Laval University, Département de Génie Civil; 2002.
11. **Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI)** [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>]
12. Liu Y, Zhang J, Liu Q, Zhang C, Ma Q: **Molecular Cloning of Novel Cellulase Genes cel9A and cel12A from *Bacillus licheniformis* GXN151 and Synergism of Their Encoded Polypeptides.** *Current Microbiology* 2004, **49**:234–238.
13. Ahmed I, Yokota A, Yamazoe A, Fujiwara T: **Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2007, **57**:1117-1125.
14. Ntougias S, Zervakis GI, Kavroulakis N, Ehaliotis C, Papadopoulou KK: **Bacterial Diversity in Spent Mushroom Compost Assessed by Amplified rDNA Restriction Analysis and Sequencing of Cultivated Isolates.** *System Appl Microbiol* 2004, **27**:746-754.
15. Green SJ, Inbar E, Michel FC, Hadar Y, Minz D: **Succession of Bacterial Communities during Early Plant Development: Transition from Seed to**

- Root and Effect of Compost Amendment.** *Appl Environ Microbiol* 2006, 72:3975-3983.
16. Scheldeman P, Goossens K, Rodriguez-Diaz M, Pil A, Goris J, Herman L, De Vos P, Logan NA, Heyndrickx M: ***Paenibacillus lactis* sp. nov., isolated from raw and heat-treated milk.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2004, **54**:885-891.
 17. Takebayashi S, Narihiro T, Fujii Y, Hiraishi A: **Water availability is a critical determinant of a population shift from Proteobacteria to Actinobacteria during start-up operation of mesophilic fed-batch composting.** *Microbes Environ* 2007, **22**:279-289.
 18. Hiraishi A, Narihiro T, Yamanaka Y: **Microbial community dynamics during start-up operation of flowerpot-using fed-batch reactors for composting of household biowaste.** *Environmental Microbiol* 2003, **5**:765-776.
 19. Kim JK, Park KJ, Cho KS, Nam SW, Park TJ, Bajpai R: **Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains.** *Bioresource Technology* 2005, **96**:1897-1906.
 20. Rittmanna BE, Stilwella D, Ohashib A: **The transient-state, multiple-species biofilm model for biofiltration processes.** *Water Research* 2002, **36**:2342-2356.
 21. Papen H, Von Berg R: **A MPN method for the estimation of cell numbers of heterotrophic nitrifying bacteria in soil.** *Plant and Soil* 1998, **199**:123-130.
 22. Yan L, He Y, Kong H, Tanaka S, Lin Y: **Isolation of a new heterotrophic nitrifying *Bacillus* sp. strain.** *Journal of Environmental Biology* 2006, **27**:323-326.

23. Kotilainen P, Jalava J, Meurman O, Lehtonen O, Rintala E, Seppala O, Eerola E, Nikkari S: **Diagnosis of meningococcal meningitis by broad-range bacterial PCR with Cerebrospinal fluid.** *J Clin Microbiol* 1998, **36**:2205-2209.

2.11 Figure

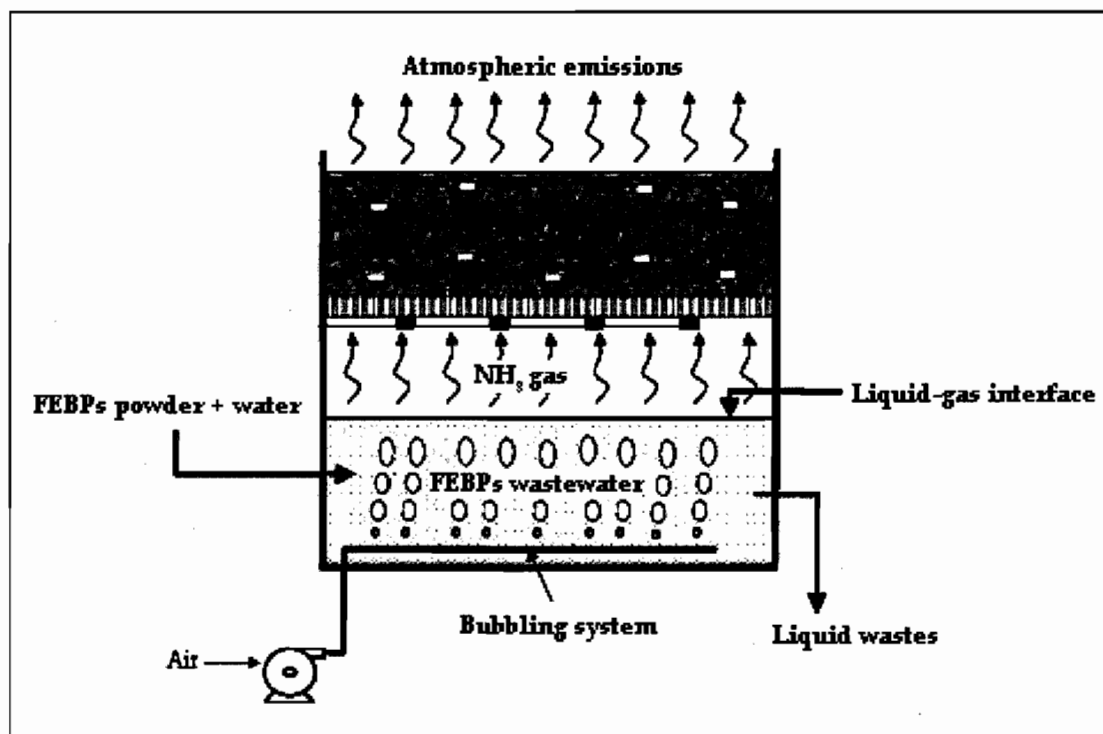


FIGURE 2.1 : The bioreactor for FEBPs treatment at NH_4Cl .
Modified from Turgeon et al. [7]

2.12 Tables

TABLE 2.1: Bacterial counts on TSA plates

Sampling campaign	Count on TSA cfu/g filter's media
08/11/2006	$> 10^6$
09/19/2006	1.5×10^7
01/23/2007	8.3×10^6
01/27/2007	5.3×10^6
Average	9.5×10^6

TABLE 2.2: Nitrogen transformation in the PMSA media by isolated strains

Isolated Strains	NO₃ → NO₂	NO₃ → ?	NO₂ → gas	NO₂ → ?
HA1	X			
HA2				
HA3		X	X	
HA4			X	
HA5	X			
HA6				
HA7		X		
HJ1	X			
HJ2		X		
HJ3				
HJ4	X			X
HJ5		X		
HJ6				

TABLE 2.3: 16S rRNA identification of isolated strains

Isolated strain	Sequence length (bases pairs)	Most related strain	% Identity	GeneBank Accession number	Reference
HA1	1400	<i>Bacillus licheniformis</i> strain gxn151	100%	[AY445620]	[12]
HA2	1450	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	100%	[AB271743]	[13]
HA3	1360	<i>Bacillus sp. BM-11_1</i>	99%	[AY635875.1]	[14]
HA4	1398	<i>Sphingobacterium composta</i>	98%	[AB244764]	[15]
HA5	1363	<i>Paenibacillus lactis</i>	99%	[AY257868.1]	[16]
HA7	1404	<i>Bacillus sp. BM-11_1</i>	99%	[AY635875.1]	[14]
HJ4	1373	<i>Bacillus sp. BM-11_1</i>	99%	[AY635875.1]	[14]
HJ6	1430	<i>Bacillus pumilus</i>	99%	[AM237349]	[17, 18]

CHAPITRE III

ARTICLE SCIENTIFIQUE 2

3.1 Ammonia removal in a saline industrial wastewater by *Vibrio alginolyticus*

Jean-François Vermette¹, Jean Laperrière², Marc Sirois^{1*}

¹ Université du Québec à Trois-Rivières, département de chimie-biologie, 3351 boul. des Forges, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9H 5H7.

² Norsk Hydro Canada Inc., 7000 boul. Raoul-Duchesne, Bécancour Québec, Canada, G0X 1B0.

*Corresponding author. Tel: (819) 376-5011 ext. 3999 Fax: (819) 376-5084.

Email addresses:

JFV: jean-francois.vermette@uqtr.ca

JL: jean.laperriere@hydro.com

MS: marc.sirois@uqtr.ca

(Voir instructions aux auteurs à l'Annexe B)

3.2 Abstract

Nitrogen wastes in the environment lead to eutrophication of freshwaters and are therefore a major problem for many industries. Ammonia is one of the most common forms of nitrogenous wastes and it can be removed by autotrophic or heterotrophic bacteria. However, high load ammonia removal is difficult to obtain in saline and alkaline wastewaters. This study shows the capacity of *Vibrio alginolyticus*, a marine heterotrophic bacterium, to remove ammonia in the saline (20 to 35 g l⁻¹ salts) and alkaline (pH 9,5 to 9,9) wastewater of Norsk Hydro Canada Inc., a magnesium plant located in Bécancour QC, Canada. During six lab-scale experiments using sodium tri-polyphosphate and table sugar as nutrients, *V. alginolyticus* removed an average of 110 mg N-NH₄ l⁻¹ d⁻¹. This study leads the way for nitrogen removal in extreme wastewaters.

Keywords: Ammonia; Industrial wastewater; Nitrifying bacteria; Nitrogen removal; Halophilic; *Vibrio alginolyticus*

3.3 Introduction

Ammonia removal in industrial wastewaters is done efficiently by autotrophic nitrifying bacteria (Limpiyakorn et al. 2005, Schmidt et al. 2003) and by some heterotrophic bacteria (Schmidt et al. 2003, Stevens et al. 2002). However, only a few studies were conducted at high ammonia (> 100 mg l⁻¹) and salts concentration (> 10 g l⁻¹). Among them, Campos et al. (2002) obtained satisfying results in an activated sludge unit using synthetic wastewater. However, results were obtained with autotrophic bacteria which are slow to reproduce, with a doubling time of 7-8h under ideal conditions (Hagopian and Riley 1998). Consequently, they require a long solid retention time in the reactor as well as very specific conditions of pH, temperature and light exposure (Hagopian and

Riley 1998). It makes autotrophic bacteria easily overcome by heterotrophic contaminants in an industrial wastewater with varying conditions.

A marine heterotrophic bacterium, *Vibrio alginolyticus*, has already shown the capacity to remove high load ammonia gas in a laboratory scale biofilter under saline conditions (Kim and Shoda, 2002). The purpose of our study was to investigate the potential for ammonia removal by *V. alginolyticus* in the bioreactor of Norsk Hydro Canada Inc. (NHCI), a magnesium plant located at Bécancour QC, Canada. The function of this bioreactor is to deactivate the Foundry and Electrolysis By-Products (FEBPs) generated by the plant by mixing with water, as shown in Fig. 3.1. The wastewater hence produced contains 20 to 35 g l⁻¹ of salts and it liberates high load of ammonia gas (up to 400 ppmv) that is removed by nitrifying bacteria in a BIOSORTM biofilter (Turgeon et al. 2004).

Upstream ammonia removal in the saline liquid phase would lower the load of the biofilter. It would result in a higher FEBPs treatment capacity and reduce ammonia releases in the environment. We conducted several flasks experiments using the FEBPs wastewater to show the capacity of *V. alginolyticus* to improve the efficiency of this industrial process.

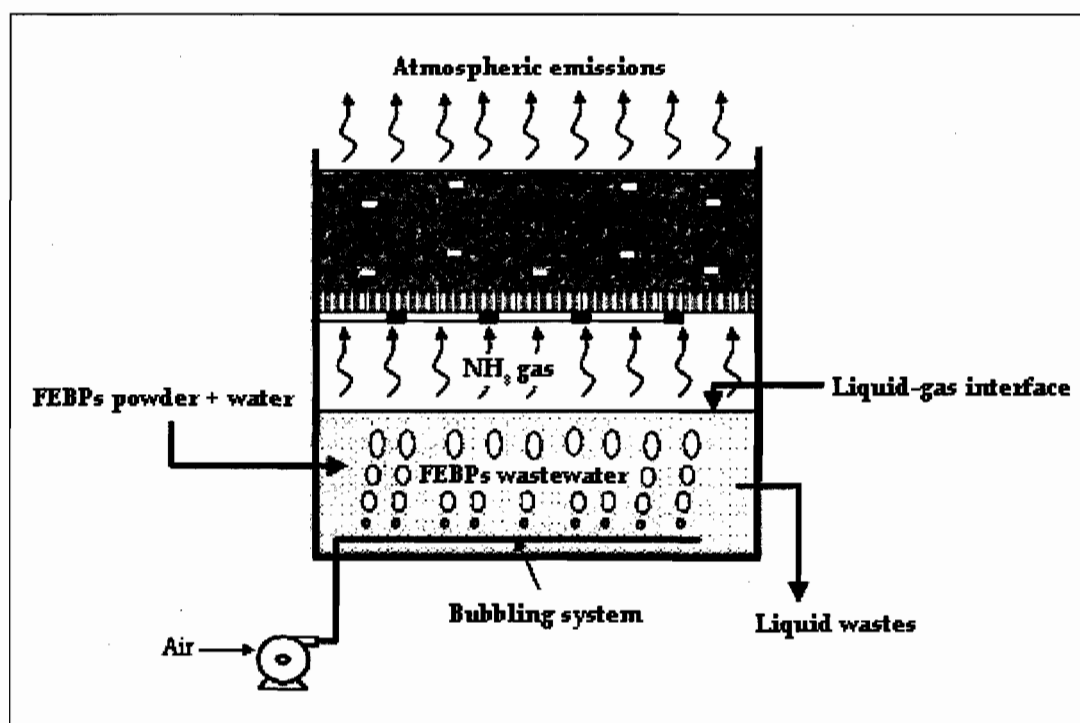


FIGURE 3.1. The bioreactor for FEBPs treatment at NHCI (modified from Turgeon et al. 2004)

3.4 Materials and methods

3.4.1 Strain and media used

The bacterium used was a laboratory isolate of *V. alginolyticus*. It was kept on sheep blood agar plates and transferred on fresh medium every 14 days. To count the number of bacteria in the various samples, we used *Vibrio*'s specific TCBS agar plates. Liquid inoculums of *V. alginolyticus* were prepared by mixing a colony in 10 ml of TSB medium and growing 24h at 20-25°C. This led to about 10^7 colony forming units (cfu) per ml on TCBS plates and about 10^8 cfu ml⁻¹ on TSA plates, as shown in table 3.1. All media were obtained from the Difco Company (Lawrence KS, USA).

TABLE 3.1
Bacterial counts in pure cultures of *V. alginolyticus*
 counts on TCBS counts on TSA

	(cfu/ml)	(cfu/ml)
TSB culture 1	$3,8 \times 10^6$	$9,4 \times 10^7$
TSB culture 2	$3,4 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$
TSB culture 3	$3,4 \times 10^6$	$6,2 \times 10^7$
TSB culture 4	$1,4 \times 10^7$	$7,5 \times 10^7$
TSB culture 5	$2,4 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$
<i>Average</i>	$1,6 \times 10^7$	$9,4 \times 10^7$

3.4.2 Wastewater composition

As previously mentioned, the NHCI wastewater is generated by dissolving the FEBPs. These by-products are composed principally of salts (NaCl, CaCl₂, MgCl₂), oxides (MgO, Al₂O₃, CaO), metals (Mg, Al) and nitrides (Mg₃N₂, Al₂N₃), according to Laperrière and Courcy (2001). Since the proportion of those components and the FEBPs loading rate are variable, the wastewater composition is variable as well. Table 3.2 presents the chemical characteristics of the wastewater with their standard deviation, based on 18 sampling performed between 2005 and 2007. Analyses were conducted at the internal laboratory of NHCI. The concentration in salts in the wastewater, which is ranging from 20 to 35 g l⁻¹, is comparable to seawater (average of 35 g/L).

Table 3.2
Chemical characteristics of the FEBPs wastewater
 Concentrations are in mg l⁻¹

	Average	SD
pH	9,7	0,2
Cl	17000	6000
Ca	3300	1200
Na	4400	1700
Mg	1300	400
K	400	150
P*	<1,5	-
NH ₃ -N	260	150
NTK	290	130
Total salts	26000	8000

*Only 5 of the 18 samples were analysed for phosphorus

3.4.3 Experimental setup

The lab-scale experiments were conducted with conditions similar to those of the NHCI bioreactor. We worked with 200 ml batches of wastewater in 300 ml Erlenmeyer flasks. Magnetic agitators and a Maxima air pump for aquaria (Hagen Company, Montréal QC, Canada) were used to emulate the propeller mixers and the bubbling aeration system of the bioreactor. For each test, the flasks were inoculated with 1 ml of TSB culture of *V. alginolyticus*. The assays were conducted under non-sterile conditions, at 25-30°C, over 24h. This duration is slightly shorter than the bioreactor liquid retention time (about 30h). It was found that addition of carbon and phosphorus to the FEBPs wastewater was

necessary to observe bacterial growth. Granulated table sugar (Redpath, Toronto ON, Canada) was used as the carbon source and NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, St-Louis MO, USA), Superphosphate commercial fertilizer (Agrocentre Vinisol, Nicolet QC, Canada) as well as sodium tri-polyphosphate (Univar, Montréal QC, Canada) were tested as phosphorus sources. A non-inoculated reference flask was prepared each time and treated identically as the other flasks. The setup is illustrated in Fig 3.2.

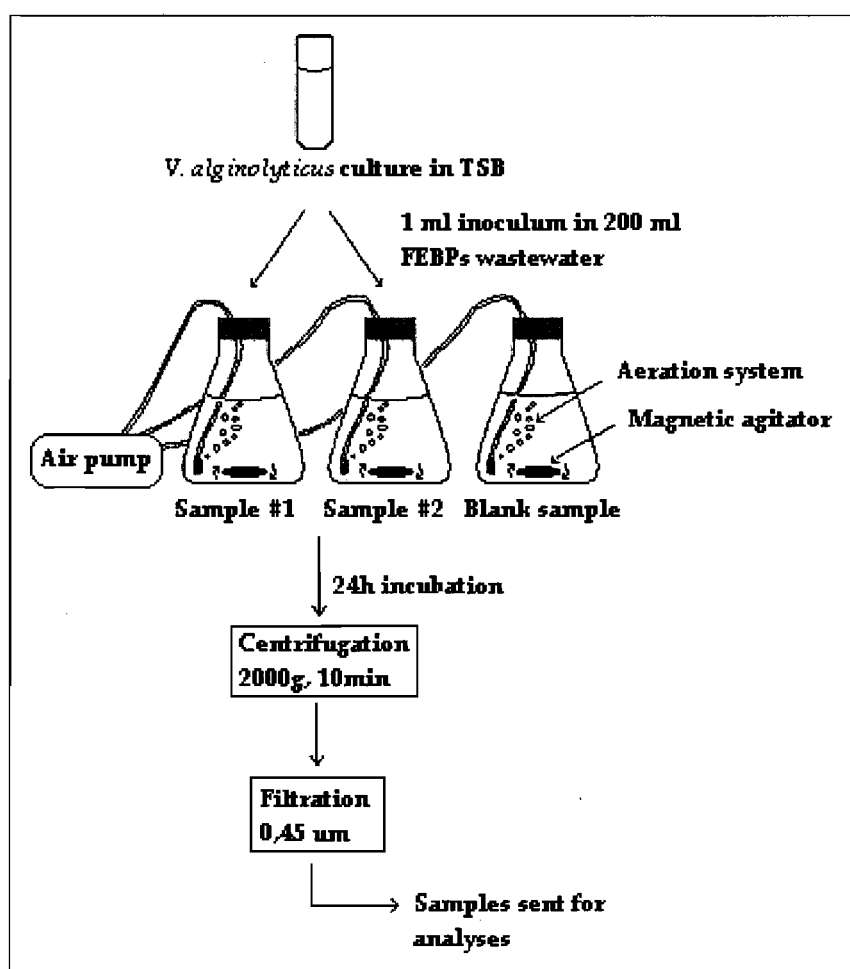


FIGURE 3.2 : Experimental setup

3.4.4 Samples preparation and chemical analyses

After the 24h essays, samples were recovered and centrifuged at 2000 g for 10 minutes with a Allegra 6R Centrifuge (Beckman Coulter, Fullerton CA, USA). The supernatant was then filtered with 0,45 µm syringe filters (Nalgene labware, Rochester NY, USA) to remove the bacteria. Samples were sent to Biolab Environmental Laboratories (Trois-Rivières QC, Canada) to be analysed for various parameters. Comparing ammonia concentration with the reference sample permitted to evaluate the ammonia removal rate.

3.5 Results

3.5.1 Testing different phosphorus sources

Several experiments with different samples of FEBPs wastewater were conducted. We first tried KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 and Superphosphate as phosphorus sources, while table sugar was used for carbon supply. It was found that those phosphorus compounds were poorly soluble, especially for Superphosphate. This is due to the high pH and the elevated salinity of the FEBPs wastewater. Moreover, KH_2PO_4 and NaH_2PO_4 induced an important pH drop and precipitation of solid compounds in the solution. We finally tried STPP, and it showed sufficient solubility to support important bacterial growth in our wastewater. We conducted six experiments using STPP and table sugar as nutrients at different concentrations, as shown in table 3.3. Each experiment contained 2 or 3 samples inoculated with *V. alginolyticus* and a blank sample.

TABLE 3.3
Ammonia removal by *V. alginolyticus* in FEBPs wastewater under different conditions¹

CONDITIONS						Total salts (g l ⁻¹)	Bacterial counts on TCBS	
Sample		pH	NH ₄ (mg-N l ⁻¹)	ΔNH ₄ (mg-N l ⁻¹ d ⁻¹)	P (mg-P l ⁻¹)		<i>t</i> = 10 m (cfu ml ⁻¹)	<i>t</i> = 24 h (cfu ml ⁻¹)
ID								
Test #1	SPEFs	9,56	280	-	< 1,5	27,1	-	-
	Blank-1	9,19	275	-	2,5	27,9	0	0
	1A	9,12	290	15	3	28,6	6,8x10 ⁴	3,6x10 ⁵
	1B	9,27	285	10	1,5	27,2	3,2x10 ⁴	1,2x10 ⁵
Test #2	SPEFs	9,56	280	-	< 1,5	27,1	-	-
	Blank-2	9,02	285	-	5	27,7	0	0
	2A	7,40	265	-20	12	29,6	1,2x10 ⁴	6,9x10 ⁶
	2B	4,88	165	-120	100	29,9	1,0x10 ⁴	3,4x10 ⁸
Test #3	SPEFs	9,79	185	-	5	24,0	-	-
	Blank-3	9,27	170	-	3	23,7	0	0
	3A	6,55	50	-120	26,5	25,5	1.8x10 ⁴	3.8x10 ⁶
	3B	5,93	38,5	-131,5	15,5	24,4	2.0x10 ⁴	>6x10 ⁵ , < 2x10 ⁶
Test #4	SPEFs	9,79	185	-	5	24,0	-	-
	Blank-4	9,08	170	-	7,5	25,0	0	0
	4A	4,95	<1,0	-170	105	27,0	1.0x10 ⁴	2.8x10 ⁶
	4B	5,04	9,0	-161	85	26,8	2.4x10 ⁴	8.3x10 ⁷
Test #5	SPEFs	9,76	295	-	<1,5	27,9	-	-
	Blank-5	8,47	245	-	4,5	29,7	0	0
	5A	5,48	80	-165	75	30,2	3,0x10 ⁴	2,4x10 ⁸
	5B	5,44	180	-65	49	28,9	4,2x10 ⁴	1,8x10 ⁸
	5C	8,91	260	15	4,5	30,3	3,2x10 ⁴	0
Test #6	SPEFs	9,5	305	-	<1,5	26	-	-
	Blank-6	8,4	225	-	5,0	28	0	0
	6A	4,8	80	-145	70	29	8,2x10 ⁴	1,8x10 ⁸
	6B	4,8	95	-130	70	29	1,2x10 ⁵	2,4x10 ⁸
	6C	4,8	115	-110	60	29	1,1x10 ⁵	3,2x10 ⁸

¹ Test #1: 10 g l⁻¹ Table sugar, 50 mg l⁻¹ STPP

Test #2: 10 g l⁻¹ Table sugar, 1000 mg l⁻¹ STPP

Test #3: 5 g l⁻¹ Table sugar, 200 mg l⁻¹ STPP

Test #4: 5 g l⁻¹ Table sugar, 1000 mg l⁻¹ STPP

Test #5: 5 g l⁻¹ Table sugar, 500 mg l⁻¹ STPP

Test #6: 5 g l⁻¹ Table sugar, 500 mg l⁻¹ STPP

3.5.2 Bacterial counts

The bacterial counts after 10 minutes and 24 hours were estimated for each sample by spreading on TCBS agar plates with different dilution ratios. About 10^4 to 10^5 cfu ml⁻¹ were found in the FEBPs wastewater 10 minutes after the beginning of the tests, which is consistent with the number of inoculated cells. After the 24h incubation time, the bacteria proliferated in all samples except #5C. Bacterial growth was also poor in test #1, where the STPP concentration used was the lowest (50 mg l⁻¹). The bacterial counts reached up to 10^8 cfu ml⁻¹ in some samples. However we must keep in mind that our bacterial counts underestimate the real quantity of living cells in the FEBPs wastewater, since pure cultures of *V. alginolyticus* lead to more colonies on TSA plates than on TCBS plates (table 3.1). Counts on TCBS should be considered as a qualitative indication of bacterial growth rather than a quantitative measure.

3.5.3 Ammonia removal efficiency

During the experiments with STPP and table sugar, we obtained an average removal rate of 110 mg-N l⁻¹ d⁻¹ and a maximum of 170 mg-N l⁻¹ d⁻¹. There is a positive correlation between ammonia removal and bacterial proliferation in the wastewater. Our results also showed that ammonia removal efficiency is highly influenced by the availability of water-soluble phosphorus. One can see that the growth of *V. alginolyticus* is inducing acidification of the wastewater. This leads to greater solubility of the phosphorus in the inoculated samples, since low pH facilitates the hydrolysis and solubilisation of condensed phosphates (Tardat-Henry and Beaudry, 1992).

3.6 Discussion

This study has shown that *V. alginolyticus* is able to remove ammonia efficiently in the saline wastewater of NHCI. The greatest challenge was to find an adequate source of phosphorus that is easily soluble in the wastewater despite the alkaline pH and the elevated concentration in salts. STPP showed a sufficient solubility leading to great ammonia removal efficiency. It can be bought in bulk from various chemical suppliers for about 1,00 to 2,00 US\$ per kg. This low price makes STPP an accessible phosphorus source for industrial use.

The high salinity of the FEBPs wastewater (average of 26 g l⁻¹) inhibits the growth of most micro-organisms. Thus, halophilic *V. alginolyticus* is able to proliferate easily in this extreme environment without important inter-species competition, despite the non-sterile conditions. Since ammonia is the only accessible nitrogen source in our wastewater, the bacterium is forced to use it in order to proliferate, leading to ammonia removal. However, the under-lying mechanisms used by the bacterium have still not been extensively studied. According to Kim and Shoda (2002), it appears that the main processes involved are the uptake of ammonia by the cells, the reaction of ammonium ions with metabolites and the conversion of ammonia to amino acids.

Our experiments showed an average ammonia removal rate of 110 mg-N l⁻¹ d⁻¹. Such removal in the NHCI bioreactor would lower greatly the load of the biofilter, leading to a better efficiency of the nitrifying bacteria that are currently partly inhibited by free ammonia. This inhibition is caused by the high loading rate (10 mg-N-NH₃ g-dry media⁻¹ d⁻¹) and the high pH (9.0-9.5) of the biofilter. The utilisation of *V. alginolyticus* could

greatly lower ammonia discharge in the environment. Nevertheless, introducing this bacterium to NHCl or any other industrial wastewater treatment system would require more studies. First, we would need to find the minimal phosphorus and sugar requirements to ensure sufficient ammonia removal without generating nutrient wastes, which stimulates eutrophication of freshwaters. Ideally, the totality of nutrients added to the wastewater must be consumed in place by the bacterium within the retention time of the reactor. Secondly, we would have to investigate the pathogenic potential of *V. alginolyticus*, which was found in a few medical cases (Gomez et al. 2003, Novotny et al. 2004, Schmidt et al. 1979). Conception of a genetically modified non-pathogenic strain could be considered.

Nevertheless, our results show that it's achievable to proceed to heterotrophic ammonia removal in a saline and alkaline wastewater, using only cheap nutrients. Even if our experiments do not lead to practical introduction of *V. alginolyticus* in NHCl, we developed an approach that can be applied to most wastewaters for biological removal. Our procedure consists in three simple steps: 1- Find a micro-organism that is able to proliferate in the wastewater, using the substrate to remove 2- Identify the minimal nutrients needed for proper growth of the micro-organism in that specific environment 3- Make those nutrients accessible for the micro-organism in the wastewater. We think the future of biological removal is very promising, even for extreme environments, by taking advantage of the wide diversity of micro-organisms.

3.7 Conclusions

1. From 6 lab-scale experiments, we obtained an average of $110 \text{ mg N-NH}_3 \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ removal with *V. alginolyticus* in the saline and alkaline wastewater of NHCl.
2. The availability of dissolved phosphorus in the wastewater was a key parameter for successful ammonia removal. STPP has shown to be an efficient source of phosphorus.
3. *V. alginolyticus* proliferated efficiently in every flask that led to ammonia removal. However, exact quantification of the living cells in the wastewater is somewhat difficult.
4. Our results showed that heterotrophic ammonia removal is achievable in extreme wastewaters, using inexpensive nutrients. There are possibilities to introduce *V. alginolyticus* or another bacteria in the FEBPs' process of NHCl.

3.8 Acknowledgements

Jean-François Vermette was supported by an Industrial Postgraduate Scholarships of the National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC). We are also grateful to all the employees of NHCI who worked on the FEBPs treatment process.

3.9 References

Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Sánchez, M., Méndez, R., Lema, J.M., 2002. Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit. *Water Research* 36(10), 2555-2560.

Gomez, J. M., Fajardo, R., Patin, J. F., Arias, C. A., 2003. Necrotizing fasciitis due to *Vibrio alginolyticus* in an immunocompetent patient. *Journal of clinical microbiology* 41(7), 3427-3429.

Hagopian, D.S., Riley, J.G., 1998. A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquacultural Engineering*, 18(4), 223-244.

Kim, N.J., Shoda, M., 2002. Removal of a high load of ammonia by a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus* in biofilter. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7(4), 316-322.

Laperrière, J., Courcy, R., 2001. Demande d'un certificat d'autorisation pour le traitement et la valorisation des SPEF. Document présenté au Ministère de l'Environnement, Norsk Hydro Canada Inc., Bécancour PQ, Canada, 32 pp.

Limpiyakorn, T., Shinohara, Y., Kurisu, F., Yagi, O., 2005. Communities of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of various sewage treatment plants in Tokyo. *FEMS microbiol. ecol.* 54(2), 205-217.

Novotny, L., Dvorska, L., Lorencova, A., Beran, V., Pavlik, I., 2004. Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. *Vet. Med. Czech* 49(9), 343-358.

Schmidt, I., Sliemers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J., Jetten, M., Strous, M., 2003. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS microbiol. rev.* 27(4), 481-492.

Schmidt, U., Chmel, H., Cobbs, C., 1979. *Vibrio alginolyticus* infections in humans. *Journal of clinical microbiology* 10(5), 666-668.

Stevens, W.E., Drysdale, G.D., Bux, F., 2002. Evaluation of nitrification by heterotrophic bacteria in biological nutrient removal processes. *South African journal of sciences* 98, 222-224.

Tardat-Henry, M., Beaudry, J.-P., 1992. *Chimie des eaux*, première édition revue et corrigée, Éditions Le Griffon d'argile, Sainte-Foy (PQ), p.157.

Turgeon, N., Buelna, G., Le Bihan, Y., Ouellet, B., Grenon, N., Bélanger, D., 2004. Treatment of industrial air emissions highly contaminated with ammonia using biofiltration on an organic bed case study : Norsk Hydro Canada Inc. USC-CSC-TRG Conference on Biofiltration 2004, Redondo Beach CA, 9 pp.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1 Premier volet : bactéries hétérotrophes du biofiltre

4.1.1 Synthèse des résultats

Nous avons échantillonné le biofiltre à quatre reprises entre août 2006 et janvier 2007. Nous avons effectué des cultures de bactéries hétérotrophes non-fastidieuses à partir de ces échantillons de milieu filtrant. Les dénombrements ont aboutis à une moyenne de 10^7 unités formatrices de colonies (cfu) par gramme de milieu filtrant. Nous considérons cette valeur comme élevée, compte tenu de la faible accessibilité du carbone organique dans le biofiltre. D'ailleurs, ce nombre dépasse sans doute la quantité de bactéries nitrifiantes dans le biofiltre, pour lesquelles la valeur cible fixée par le CRIQ au départ du projet était de 10^4 - 10^6 NPP/g milieu filtrant (Turgeon et al. 2004).

Les colonies des échantillonnages du 11/08/2006 et du 23/01/2007 ont été isolées en cultures pures par succession de repiquages sur géloses TSA. Nous avons sélectionné seulement les colonies les plus nombreuses, qui étaient présentes sur les géloses des chacun des quatre échantillons de milieu filtrant. Ainsi, nous sélectionnons les souches les plus abondantes, qui étaient présentes dans toutes les strates du biofiltre et qui risquaient d'être celles jouant un plus grand rôle dans le milieu filtrant. Nous avons ainsi recueilli 13 souches, dont 7 isolées au mois d'août et 6 isolées au mois de janvier.

Nous avons effectué des réactions en chaîne de la polymérase (PCR) pour l'amplification du gène de l'ARN 16S de chacune des bactéries isolées, en utilisant des amorces universelles pour les bactéries. Nous avons ensuite envoyé les amplicons à un laboratoire externe pour procéder au séquençage. Le gène de l'ARN 16S est très conservé chez les eubactéries mais contient plusieurs régions variables qui permettent une identification relativement précise de genre ou de l'espèce, en comparant avec des banques de données publiques. Parmi les 13 souches isolées, nous avons obtenu 8

séquences valables pour une bonne identification avec le « Basic Local Alignment Search Tool » (BLAST) du NCBI. Les séquences obtenues à partir des autres bactéries étaient trop courtes pour une identification significativement valable. La plupart des souches isolées ont été identifiées comme des *Bacillus*, qui sont des eubactéries Gram positives sporulantes. Toutes les souches identifiées sont connues pour tolérer une salinité et une alcalinité élevées, des conditions que l'on retrouve dans le biofiltre. De plus, certaines d'entre elles ont déjà montré la capacité de dégrader les produits de la lignocellulose, qui pourraient servir de source de carbone dans le biofiltre. Ce sont probablement des bactéries spécialistes, s'étant successivement établies dans le biofiltre depuis l'environnement externe ou étant déjà présentes dans le milieu filtrant au départ du procédé, et ayant la capacité de dégrader les composants du milieu filtrant pour y puiser le carbone dont elles ont besoin.

Afin de tester les transformations d'azote de nos bactéries, nous avons élaboré des milieux liquides inspirés du milieu « Peptone-meat extract soft agar » (PMSA) employé par Papan et von Berg (1998). Nous avons conçu trois milieux semblables ; un milieu PMSA-NH₄ contenant de l'ammoniac, un milieu PMSA-NO₃ contenant du nitrate et un milieu PMSA-NO₂ contenant du nitrite. Nous avons inoculé chacune de nos bactéries dans chacun de ces milieux, en aérobie, à 37°C et ce pendant 16 jours. Nous avons évalué qualitativement la croissance bactérienne, la consommation ou production de nitrites et nitrates dans l'échantillon ainsi que la formation de gaz à l'aide de tubes de Durham. Nous avons tout d'abord noté que toutes les souches se développaient abondamment dans chacun des milieux après 48 heures, ce qui montre qu'elles résistent à des hautes concentrations (200 mg/l) de NH₄, NO₃ et NO₂. Après l'incubation de 16 jours, 8 des 13 souches ont montré la capacité de consommer le nitrate. Pour quatre d'entre elles, du nitrite a été produit pendant le processus, alors que ni nitrite ni gaz n'a été détecté pour les quatre autres souches. Dans le dernier cas, nous pouvons expliquer cela par l'assimilation du nitrate par les bactéries pour la production de leurs acides aminés et autres composants cellulaires. Une autre hypothèse serait que la bactérie ait produit de l'ammoniac à partir du nitrate consommé. Nous ne pouvons conclure sur ce point car l'ammoniac n'était pas mesuré durant l'expérience. Quant aux autres souches

bactériennes, nous avons observé une consommation de nitrite par trois d'entre elles. Deux de ces souches ont produit un gaz durant le processus alors qu'aucun produit n'a été détecté pour l'autre bactérie. Encore une fois, nous assumons que le nitrite a été soit assimilé pour les besoins en azote de la bactérie ou encore réduit en ions ammonium. Quant aux quatre dernières souches, aucune transformation d'azote n'a été observée pendant la période d'incubation.

4.1.2 Interprétation et perspectives de recherche

Nos expérimentations permettent de constater que le biofiltre abrite une importante biomasse hétérotrophe, malgré la faible accessibilité de carbone organique. Les dénombrements effectués, de l'ordre de 10^7 cfu/g de milieu filtrant, sont élevés malgré le fait que l'on ait considéré uniquement les bactéries facilement cultivables. La plupart d'entre elles sont probablement capables de dégrader la lignocellulose ou ses sous-produits (Hurst et Crawford 2002). Cela implique une dégradation du milieu filtrant menant à une compaction du biofiltre, qui devra être remplacé éventuellement. On mesure d'ailleurs, depuis octobre 2006, une augmentation progressive de la pression différentielle à travers le biofiltre, qui indique qu'une compaction de la tourbe est en train de se produire (Annexe E).

Les souches identifiées s'apparentent à des bactéries très résistantes aux conditions de pH, de salinité et de température. La plupart sont sporulantes, ce qui leur permet de survivre aux conditions extrêmes du biofiltre, qui de plus varient énormément selon les conditions météorologiques et l'alimentation du bioréacteur. Les organismes isolés sont probablement mieux adaptés pour survivre à ce milieu que les bactéries nitrifiantes autotrophes, pour lesquelles le biofiltre avait été conçu.

Les tests biochimiques montrent que 9 des 13 souches isolées ont la capacité de transformer soit le nitrite soit le nitrate, qui sont les sous-produits de la nitrification. De plus, deux de ces souches libéraient du gaz, probablement du N_2 ou N_2O produits par une réaction de dénitrification en aérobie (Kim et al. 2005). Puisque ces gaz ne sont pas

mesurés à la sortie du biofiltre, la dénitrification en aérobie pourrait être la réponse à une interrogation au sujet du bilan d'azote du bioréacteur de NHCl. En effet, on mesure plus d'azote à l'entrée qu'à la sortie du procédé ; il y a un manque à gagner d'environ 20 kg - N par jour (Annexe F).

Les tests biochimiques que nous avons effectués ne sont pas quantitatifs et par conséquent ne permettent pas d'évaluer l'importance de ces réactions de transformation d'azote dans le biofiltre. Cela nous permet cependant de soupçonner une contribution significative des bactéries hétérotrophes pour le fonctionnement du procédé et nous amène à émettre d'autres hypothèses. Selon toute vraisemblance, il se produit dans le biofiltre des interactions complexes entre de nombreuses bactéries. Les bactéries nitrifiantes autotrophes, qui y habitent encore malgré leur faible activité, y contribuent sans doute grâce au largage de nitrites, de nitrates et de carbone organique qu'elles ont métabolisé par nitrification, aidant ainsi à soutenir une importante biomasse hétérotrophe. Il est possible que certaines bactéries hétérotrophes participent à l'enlèvement d'ammoniac, complétant ainsi le travail des bactéries nitrifiantes. Une certaine partie de l'azote est sans doute transformée en gaz N_2 ou N_2O , ce qui explique le manque à gagner du bilan d'azote. Toutes ces réactions ne se font cependant pas sans dégrader le milieu filtrant, qui demeure la première source de carbone pour les hétérotrophes. Il a été établi qu'il devra être remplacé sous peu, en prenant soin de garder intacte une bonne quantité du vieux milieu afin d'assurer la recolonisation par le présent consortium bactérien, qui semble avoir atteint un équilibre permettant une très bonne efficacité d'enlèvement d'ammoniac.

Quoiqu'il en soit, nos résultats montrent qu'il faut remettre en question la nitrification autotrophe comme unique phénomène pour l'enlèvement d'ammoniac dans le biofiltre. Advenant une suite à ce projet de recherche, il serait intéressant de dénombrer individuellement chaque bactérie du consortium, de suivre leur évolution selon les saisons, la profondeur dans le biofiltre et les diverses conditions du milieu. Les données amassées pourraient servir à diverses analyses statistiques, permettant de corréler l'efficacité du biofiltre avec l'abondance d'une bactérie donnée, selon les

conditions. Cela pourrait permettre de contrôler adéquatement le milieu pour favoriser les bactéries voulues, toujours en fonction des diverses conditions. Il serait aussi intéressant de mesurer quantitativement la consommation d'ammoniac, de nitrite et de nitrate par chacune et d'évaluer leur contribution à l'effet global dans le biofiltre. Il s'agirait d'un projet d'envergure exigeant beaucoup de temps et de ressources, mais qui permettrait de comprendre plus en détail un procédé qui a longtemps été simplifié conceptuellement.

4.2 Second volet : tests d'enlèvement d'ammoniac avec *V. alginolyticus*

Le volet précédent nous laisse donc sur le constat que le procédé étudié ici, soit le biofiltre de NHCl, est bien plus complexe qu'escompté et que nous sommes loin de comprendre les paramètres assurant son efficacité. Le milieu filtrant ne contient pas uniquement des bactéries nitrifiantes dont nous connaissons bien les caractéristiques, mais plutôt une panoplie de bactéries qui interagissent dans un consortium complexe. Quoique mieux informés sur la nature du fonctionnement du biofiltre, nous ne sommes toujours pas en mesure d'exercer un contrôle rigoureux de son efficacité. Les objectifs voulant explorer les possibilités d'améliorer le bioréacteur et d'étudier une alternative advenant une chute d'efficacité du procédé gagnent en pertinence suite aux résultats du premier volet.

4.2.1 Synthèse des résultats

Les résultats présentés ici sont le fruit de six séances expérimentales au cours desquelles nous avons ajouté du phosphore et du sucrose (ou sucre de table) à différentes concentrations dans la solution de SPEFs. Nous y avons inoculé *V. alginolyticus* pendant 24h, dans des flacons erlenmeyer de 300 ml en reproduisant les conditions du bioréacteur (30°C, agitation et aération continues, milieu non-stérile). Nous avons inoculé un aliquote des différents échantillons sur géloses, 10 minutes et 24 heures après l'ajout de la bactérie pour évaluer sa prolifération. Nous avons aussi fait analyser par un laboratoire externe plusieurs variables chimiques, dont la concentration en ammoniac,

que nous pouvions comparer avec un échantillon de référence pour évaluer l'enlèvement occasionné par la bactérie.

Il s'est avéré qu'il nous fallait ajouter une source de carbone et une source de phosphore au liquide afin que la bactérie prolifère, ces éléments étant absents de la composition des SPEFs. Plusieurs caractéristiques devaient être considérées pour le choix des produits à utiliser : une bonne solubilité dans notre milieu, un faible coût et l'absence totale d'azote, afin que la bactérie consomme l'ammoniac pour combler ses besoins. Le choix de la source de carbone fût plutôt simple : nous avons utilisé du sucre de table (sucrose), qui s'est avéré efficace et bon marché (1-2 \$/kg). Le choix de la source de phosphore fût cependant plus problématique. Nous avons d'abord essayé du KH_2PO_4 , du NaH_2PO_4 ainsi qu'un engrais commercial appelé Superphosphate, qui ont tous montrés des problèmes de faible solubilité dans le liquide. Nous avons finalement essayé le sodium tri-polyphosphate (STPP), qui a montré une solubilité suffisante dans notre milieu pour induire une prolifération bactérienne importante. C'est la source de phosphore qui a été utilisée pour les expériences présentées ici.

Les dénombrements bactériens étaient réalisés sur géloses TCBS, un milieu spécifique à la culture du genre *Vibrio*. Nous avons obtenu de 10^4 à 10^5 cfu/ml au départ des différents tests. À la fin des périodes d'incubation de 24h, la bactérie avait proliféré dans presque tous les échantillons. La croissance bactérienne était faible au test #1, lors duquel la concentration de STPP utilisée était la plus basse (50 mg/l). Les dénombrements ont atteint jusqu'à 10^8 cfu/ml pour certains échantillons, ce qui signifie une multiplication du nombre de cellules allant jusqu'à 10 000 fois.

Nous avons obtenu un enlèvement d'ammoniac moyen de 110 mg N/l/jour, pour un maximum de 170 mg N/l/jour. Il y a une bonne corrélation entre la quantité d'ammoniac enlevé et la prolifération bactérienne dans le liquide. Nos résultats montrent que l'enlèvement d'ammoniac est hautement influencé par la disponibilité du phosphore dans nos échantillons. Nous remarquons également que la croissance de *V. alginolyticus* dans la solution de SPEFs induit une baisse de pH, ce qui mène l'augmentation

progressive de la solubilité du phosphore dans les échantillons inoculés, à mesure que l'alcalinité diminue.

4.2.2 Interprétation et perspectives de recherche

Ce volet expérimental a mis en évidence la capacité d'enlèvement d'ammoniac de *V. alginolyticus* dans solution de SPEFs, qui est hautement saline et alcaline. À ce jour, les mécanismes biochimiques utilisés par la bactérie pour enlever l'ammoniac n'ont pas été étudiés en profondeur. Il semble toutefois que les principales réactions impliquées soient l'assimilation d'ammoniac par les cellules, la réaction d'ions ammonium avec des métabolites et la conversion en acides aminés (Kim et Shoda 2002).

Un enlèvement de 100 mg N-NH₄/l/jour tel que vu au cours de nos expérimentations, soit environ 30% de la quantité totale d'ammoniac, serait très profitable dans le bioréacteur de NCHI. Cela diminuerait la charge d'ammoniac à l'entrée du biofiltre ce qui permettrait peut-être un rétablissement des bactéries nitrifiantes, qui rappelons-le sont inhibées par la concentration en ammoniac libre et le pH trop élevés (section 1.4). L'enlèvement d'ammoniac dans le liquide permettrait aussi d'augmenter le taux d'alimentation du bioréacteur et diminuer les rejets azotés de l'effluent liquide. En ce moment, la portion d'ammoniac qui n'est pas évaporée en phase gazeuse ne subit aucun traitement avant d'être rejetée. Il y a simplement dilution avec les autres effluents de l'usine et rejet à l'environnement. L'utilisation d'une bactérie dans le liquide diminuerait ces rejets de façon importante.

Cependant, il serait périlleux de prétendre que l'on puisse reproduire cette efficacité à grande échelle. Il faut dire que le temps de rétention moyen du liquide (et donc de la bactérie) dans la cuve du bioréacteur est d'environ 30 heures, ce qui surpasse la durée de nos expériences. Par contre, la différence majeure entre nos expériences et le bioréacteur à grande échelle réside dans le fait que l'alimentation du procédé se fasse en continue, et non par lot (par « batch ») comme nous le faisons à petite échelle. Il est donc difficile d'estimer l'efficacité d'enlèvement d'ammoniaque que l'on obtiendrait si

on ensemencerait *V. alginolyticus* dans le bioréacteur. Des expériences à plus grande échelle, avec un système de circulation du liquide en continu, seraient nécessaires pour avoir une idée précise du potentiel réel d'un ensemencement bactérien dans le liquide.

Il y aurait donc d'autres études à faire, et surtout plusieurs réticences à surpasser avant de songer à l'utilisation de *V. alginolyticus* dans le procédé de NHCI. Il faut premièrement aborder le problème du rejet de phosphore. Au cours de nos expériences, nous avons éprouvé certaines difficultés à trouver une source de phosphore suffisamment soluble dans le liquide, compte tenu du pH et de la salinité élevés. Le STPP s'est montré efficace mais non idéal, puisque nos mesures montrent qu'une grande proportion reste non-dissoute dans nos échantillons. En l'occurrence, le rejet de phosphore dans l'environnement est très problématique, causant l'eutrophisation des cours d'eau, la prolifération d'algues bleues et autres problèmes connexes. Il serait donc aberrant de troquer notre problème d'ammoniac pour un problème de rejet de phosphore ! Advenant une suite à ce projet, il serait impératif de trouver une source de phosphore totalement soluble dans l'effluent et de doser précisément la quantité à ajouter au liquide, afin que tout ce qui est introduit soit consommé sur place par notre bactérie. Le même exercice devra évidemment être fait pour le sucre, qui peut aussi représenter une source de pollution via le rejet de nutriments.

Un autre problème important réside en l'introduction d'une grande quantité d'une espèce bactérienne dans l'écosystème aquatique. *V. alginolyticus* provient de l'eau de mer et requiert de fortes concentrations de sel pour survivre. À prime abord, il y a donc peu de risques qu'elle parvienne à s'établir dans les eaux du fleuve, là où les effluents de NHCI aboutissent. Il faut cependant agir en conformité avec les lois environnementales à ce sujet. Par surcroît, certaines souches de *V. alginolyticus* sont reconnues comme pathogènes de crustacés et de poissons en eau salée (Hörmansdorfer et al. 2000, Liu et al. 2004), et certaines ont même déjà été impliquées dans des infections humaines (Gomez et al. 2003, Novotny et al. 2004, Schmidt et al. 1979). La présence et le rejet d'une grande quantité de cette bactérie pourrait représenter une menace potentielle pour la santé. Il existe plusieurs systèmes pour éliminer les bactéries d'un effluent liquide, par

rayonnements ultra-violets par exemple, et qui pourraient permettre de réduire le risque d'introduction dans l'environnement. Par contre, cela n'empêcherait pas complètement le risque d'infections chez les travailleurs du bioréacteur. Afin de palier à ce problème, une solution pourrait être d'élaborer une souche génétiquement modifiée afin d'être non-pathogène, par délétion d'un gène de virulence par exemple. Cependant, cela changerait simplement le problème de place, puisque la réglementation pour l'introduction d'OGM est tout aussi sévère, sinon davantage ! La meilleure alternative pour une suite à ce projet serait de trouver dans l'environnement local une autre bactérie halophile, n'ayant aucun problème de pathogénicité et montrant un aussi bon potentiel d'enlèvement d'ammoniac. Le genre *Bacillus* par exemple, qui est très diversifié et omniprésent dans le sol et dans l'air, comporte une panoplie d'espèces parmi lesquelles une souche pourrait remplir ce rôle. Il est possible que ce type de bactérie se trouve dans notre environnement proximal puisque nous venons de voir, lors du premier volet expérimental, que le biofiltre est rempli de bactéries diverses, résistant au sel et à un pH alcalin ! Peut-être même que le fait d'ajouter le carbone et le phosphore manquants dans le liquide suffirait pour que ces bactéries s'y établissent de façon permanente. Cette piste est très prometteuse et vaudrait la peine d'être explorée davantage. Les bactéries en question se sont établies dans le biofiltre de façon naturelle et progressive et c'est ce genre de colonisation qui doit être privilégiée, plutôt que de forcer l'introduction d'une espèce exogène. Nos expériences avec *V. alginolyticus* nous avons permis non seulement d'élaborer une méthodologie efficace pour tester l'enlèvement d'ammoniac en laboratoire, mais aussi d'alimenter ce cheminement intellectuel quant aux autres possibilités, plus simples et moins drastiques, d'améliorer un procédé microbiologique tel que celui de NHCl.

CHAPITRE V

CONCLUSIONS

Au cours de ces travaux de recherche, nous avons étudié le biofiltre à bactéries nitrifiantes de NHCI pour l'enlèvement de hautes concentrations d'ammoniac gazeux. Ce procédé montre une efficacité surprenante malgré le fait que les bactéries nitrifiantes, pour lesquelles avait été conçu le biofiltre, sont peu actives. Ce projet avait pour but d'étudier la microbiologie du biofiltre pour mieux comprendre son fonctionnement et d'expérimenter l'utilisation d'une autre bactérie pour améliorer l'efficacité du procédé ou encore servir d'alternative en cas d'arrêt de fonctionnement du biofiltre.

Nous avons présenté ici deux articles scientifiques correspondant aux volets expérimentaux de nos recherches. Le premier décrivait notre étude des bactéries hétérotrophes du biofiltre que nous avons dénombrées, isolées en cultures pures, identifiées par séquençage du gène de l'ARN 16S et testées pour diverses transformations d'azote. Suite à cette étude nous sommes arrivés aux conclusions suivantes :

- le biofiltre abrite plusieurs bactéries hétérotrophes, de l'ordre de 10^7 cfu/g de milieu filtrant;
- ces bactéries hétérotrophes dégradent le milieu filtrant menant à sa compaction et il devra être changé éventuellement;
- les bactéries hétérotrophes jouent probablement un rôle important dans le biofiltre. Il faut considérer des interactions complexes entre les nombreux microorganismes d'un consortium;
- ces découvertes permettent une remise en question de la nitrification autotrophe comme unique phénomène pour l'enlèvement d'ammoniac dans le biofiltre.

Le deuxième article, supporté par les résultats du premier volet quant à l'immense complexité du biofiltre et notre méconnaissance des réactions impliquées, avait comme objectif de tester l'enlèvement d'ammoniac dans la phase liquide du

bioréacteur, qui est hautement saline et alcaline. Nous avons recréé à petite échelle les conditions du bioréacteur, ajouté les nutriments manquants au liquide (phosphore et carbone), mesuré l'enlèvement d'ammoniac et la prolifération bactérienne occasionnés. Nous en avons conclu que :

- jusqu'à 10^8 cfu/ml de *V. alginolyticus* se développait dans la solution de SPEFs, occasionnant un enlèvement d'ammoniac moyen de 110 mg N-NH₄/l/jour;
- la concentration en phosphore dissout est un paramètre clé pour l'enlèvement d'ammoniac, le choix de la source de phosphore est donc critique;
- malgré les difficultés pratiques d'introduire *V. alginolyticus* à l'usine de NHCl, ces expériences ont permis de développer une méthodologie applicable ultérieurement pour d'autres bactéries, les bactéries hétérotrophes du biofiltre étant de bonnes candidates.

Finalement, notre approche se voulait exploratrice et proactive, avec comme but de mieux comprendre un processus qui s'est montré plus complexe qu'anticipé. Nos découvertes furent forts intéressantes, riches en informations et en perspectives. Elles participent à la remise en question de certains paradigmes dans le domaine des transformations microbiologiques de l'azote et nous espérons que cela contribue, de près ou de loin, à l'avancement des sciences environnementales appliquées.

BIBLIOGRAPHIE

Articles scientifiques :

Anthonisen A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B.S., Srinath, E.G. (1976) « Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid », Journal of the water pollution control federation 48(5):835-852.

Camargo, J.A., Alonso, A. (2006) « Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment », Environment international 32: 831–849.

Dalsgaard T., Thamdrup, B., Canfield, D.E. (2005) « Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment », Research in microbiology 156:457–464.

Engel, M.S., Alexander, M. (1958) « Growth and autotrophic metabolism of *Nitrosomonas europaea* », Journal of bacteriology 76(2):217–222.

Gomez, J. M., Fajardo, R., Patin, J. F., Arias, C. A. (2003) « Necrotizing fasciitis due to *Vibrio alginolyticus* in an immunocompetent patient », Journal of clinical microbiology 41(7), 3427-3429.

Hagopian, D.S., Riley, J.G. (1998) « A closer look at the bacteriology of nitrification », Aquacultural engineering 18(4):223-244.

Hörmansdorfer, S., Helmut, W., Neugebauer-Büchler, K., Bauer, J. (2000) « Isolation of *Vibrio alginolyticus* from seawater aquaria », Int. j. hyg. environ. health 203:169-175.

Jetten, M.S.M, Strous, M., van de Pas-Schoonen, K.T., Schalk, J., van Dongen, U.G.J.M., van de Graaf, A.A., Logemann, S., Muyzer, G., van Loosdrecht, M.C.M., Kuenen, J.G. (1998) « The anaerobic oxidation of ammonium », FEMS microbiology reviews 22(5):421-437.

Kim, J. K., Park, K. J., Cho, K. S., Nam, S.-W., Park, T.-J., Bajpai, R. (2005) « Aerobic nitrification–denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains », Bioresource technology 96:1897-1906.

Kim, N.J., Shoda, M. (2002) « Removal of a High Load of Ammonia by a Marine Bacterium, *Vibrio alginolyticus* in Biofilter », Biotechnol. bioprocess eng., 7:1-6.

Laperrière, J., Courcy, R. (2001) « Demande d'un certificat d'autorisation pour le traitement et la valorisation des SPEF », Document présenté au Ministère de l'environnement, Norsk Hydro Canada Inc., Bécancour PQ, Canada, 32 pp.

- Liu, P.-C., Lin, J.-Y., Hsiao, P.-T. et Lee, K.-K. (2004) « Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased cobia *Rachycentron canadum* », J. basic microbiol. 44(1);23–28.
- Meiberg, J.B., Bruinenberg, M.P.M., Harder, W. (1980) « Effect of dissolved oxygen tension on the metabolism of methylated amines in *Hyphomicrobium X* in the absence and presence of nitrate: evidence for aerobic denitrification », Journal of general microbiology 120:453-463.
- Mulder, A., van de Graaf, A.A., Robertson, L.A., Kuenen, J.G. (1995) « Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor », FEMS microbiology ecology 16, 177-184.
- Novotny, L., Dvorska, L., Lorencova, A., Beran, V., Pavlik, I. (2004) « Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings », Vet. med. czech 49(9), 343-358.
- Papen, H. and von Berg, R. (1998) « A MPN method for the estimation of cell numbers of heterotrophic nitrifying bacteria in soil », Plant and soil 199:123–130.
- Schmidt, U., Chmel, H., Cobbs, C. (1979) « *Vibrio alginolyticus* infections in humans », Journal of clinical microbiology 10(5), 666-668.
- Stevens, W.E., Drysdale, G.D., Bux, F. (2002) « Evaluation of nitrification by heterotrophic bacteria in biological nutrient removal processes », South african journal of sciences 98, 222-224.
- Turgeon, N., Buelna, G., Le Bihan, Y., Ouellet, B., Grenon, N., Bélanger, D. (2004) « Treatment of industrial air emissions highly contaminated with ammonia using biofiltration on an organic bed case study : Norsk Hydro Canada Inc », USC-CSC-TRG conference on biofiltration 2004, Redondo Beach CA, 9 pp.
- Yan, L., He, Y., Kong, H., Tanaka, S. and Lin, Y. (2006) « Isolation of a new heterotrophic nitrifying *Bacillus* sp. strain », Journal of environmental biology 27(2):323-326.
- Yani, M., Hirai, M., Shoda, M. (2000) « Enhancement of ammonia removal in peat biofilter seeded with enriched nitrifying bacteria », Environmental technology 21(10):1199-1204.
- Zumft, W. G. (1997) « Cell biology and molecular basis of denitrification », Microbiology and molecular biology reviews 61(4):533-616.

Livres de référence :

Copin-Montégut, G. (1996) « Chimie de l'eau de mer », Paris : Institut océanographique, Paris, 319 pages.

Hurst, C. J., Crawford, R. L. (2002) « Manual of environmental microbiology », 2^e éd., ASM Press, Washington, U.S.A., pp. 925-933.

Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A. (2002) « Microbiology », 5^e éd., McGraw-Hill Higher Education, New York, U.S.A., 1026 p.

Mémoires et thèses :

Gilbert, Y. (2002) « Mise au point d'une méthode respirométrique pour évaluer l'activité microbiologique d'un biofiltre à base de tourbe », Mémoire de maîtrise, Université Laval.

Joshi, J. A. (2000) « Transformation of gaseous ammonia in biofilters », Thèse de Doctorat, Rutgers, The State University of New Jersey.

Ressources de l'Internet :

Bellis, M. (juillet 2007) « History of Biofilters and Biofiltration Treatment », Uniform Resource Locator : <http://inventors.about.com/od/bstartinventions/a/biofiltration.htm>.

(juillet 2007) « Site internet de la compagnie Hydro ». Uniform Resource Locator : <http://www.hydro.com>.

ANNEXE A

Instructions aux auteurs pour article 1 (Journal of Biological Engineering)

Source : <http://www.jbioleng.org/info/instructions/>

Instructions for *Journal of Biological Engineering* authors

Preparing main manuscript text

File formats

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document:

- Microsoft Word (version 2 and above)
- WordPerfect (version 5 and above)
- Rich text format (RTF)
- Portable document format (PDF)
- TeX/LaTeX (use [BioMed Central's TeX template](#))
- DeVice Independent format (DVI)
- Publicon Document (NB)

Users of other word processing packages should save or convert their files to RTF before uploading. Many free tools are available which ease this process.

TeX/LaTeX users: We recommend using [BioMed Central's TeX template](#) and [BibTeX stylefile](#). If you use this standard format, you can submit your manuscript in TeX format (after you submit your TEX file, you will be prompted to submit your BBL file). If you have used another template for your manuscript, or if you do not wish to use BibTeX, then please submit your manuscript as a DVI file. We do not recommend converting to RTF.

Publicon users: Information about [Publicon](#) and [instructions for authoring in Publicon](#) are available.

Manuscript sections for Research articles

Manuscripts for Research articles submitted to *Journal of Biological Engineering* should be divided into the following sections:

- [Title page](#)
- [Abstract](#)
- [Background](#)
- [Results](#)
- [Discussion](#)
- [Conclusions](#)

- Methods (can also be placed after Background)
- List of abbreviations used(if any)
- Competing interests
- Authors' contributions
- Acknowledgements
- References
- Figure legends (if any)
- Tables and captions (if any)
- Description of additional data files (if any)

You can download a template (Mac and Windows compatible; Microsoft Word 98/2000) for your article. For instructions on use, see below.

The **Accession Numbers** of any nucleic acid sequences, protein sequences or atomic coordinates cited in the manuscript should be provided, in square brackets and include the corresponding database name; for example, [EMBL:AB026295, EMBL:AC137000, DDBJ:AE000812, GenBank:U49845, PDB:1BFM, Swiss-Prot:Q96KQ7, PIR:S66116].

The databases for which we can provide direct links are: EMBL Nucleotide Sequence Database ([EMBL](#)), DNA Data Bank of Japan ([DDBJ](#)), GenBank at the NCBI ([GenBank](#)), Protein Data Bank ([PDB](#)), Protein Information Resource ([PIR](#)) and the Swiss-Prot Protein Database ([Swiss-Prot](#)).

Title page

This should list: the title of the article, which should include an accurate, clear and concise description of the reported work, avoiding abbreviations; and the full names, institutional addresses, and e-mail addresses for all authors. The corresponding author should also be indicated.

Abstract

The abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: **Background**, the context and purpose of the study; **Results**, the main findings; **Conclusions**, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. **Trial Registration**, if your research article reports the results of a controlled health care intervention, please list your trial registry, along with the unique identifying number, e.g. **Trial registration:** Current Controlled Trials ISRCTN73824458. Please note that there should be no space between the letters and numbers of your trial registration number.

Background

The background section should be written from the standpoint of researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. The section should end with a very brief statement of what is being reported in the article.

Results and Discussion

The Results and Discussion may be combined into a single section or presented separately. They may also be broken into subsections with short, informative headings.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

Methods (can also be placed after Background)

This should include the design of the study, the setting, the type of participants or materials involved, a clear

description of all interventions and comparisons, and the type of analysis used, including a power calculation if appropriate.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text either they should be defined in the text where first used, or a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

Competing interests

A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Authors should disclose any financial competing interests but also any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript.

Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'.

When completing your declaration, please consider the following questions:

Financial competing interests

- In the past five years have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? Is such an organization financing this manuscript (including the article-processing charge)? If so, please specify.
- Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? If so, please specify.
- Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content of the manuscript? Have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify.
- Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

Non-financial competing interests

Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript? If so, please specify.

If you are unsure as to whether you, or one your co-authors, has a competing interest please discuss it with the editorial office.

Authors' contributions

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

An "author" is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and 3) have given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support.

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the study by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include their source(s) of funding. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements.

Please list the source(s) of funding for the study, for each author, and for the manuscript preparation in the acknowledgements section. Authors must describe the role of the funding body, if any, in study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication.

References

All references must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Reference citations should not appear in titles or headings. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text. Notes/footnotes are not allowed. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited author(s) is the responsibility of the author. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should contain all named authors, regardless of how many there are.

We encourage authors to use a recent version of EndNote (version 5 and above) or Reference Manager (version 10) when formatting their reference list, as this allows references to be automatically extracted. Authors submitting articles in EndNote 5 or higher or Reference Manager 10 format will save £30 on the £850 (€1140, US\$1675) article processing charge. In order to obtain this discount, you should upload the manuscript file containing your EndNote or Reference Manager-formatted bibliography as a .doc file. Please ensure you do not convert to another format (e.g. RTF or PDF). On upload, the discount will be automatically granted and you will receive a confirmation on-screen and by email. You will also be able to preview an HTML version of the extracted references during submission, and we urge authors to check this. EndNote or Reference Manager users should also make sure that any changes made to the reference list are done within their reference management program, rather than by manually editing the formatted bibliography. This is because manually introduced changes will not be picked up in the automatically extracted list.

Further details about [EndNote](#) and [Reference Manager](#) are available on the BioMed Central site, including style files that conform to the BioMed Central style and information about how to upgrade. Users of other reference management programs should be able to select other journal styles that output a numeric list styled similarly to the guide below.

For EndNote users, we provide a [detailed technical guide](#) to help with resolving problems that are encountered with the automated reference extraction process. Please check that your reference extraction is accurate after uploading the manuscript text file.

We are also working towards integrating data from RefWorks referencing software. We are working in partnership with the development team of [RefWorks](#) to produce a high quality extraction process.

Examples of the *Journal of Biological Engineering* reference style are shown below. Please take care to follow the reference style precisely; references not in the correct style may be retyped, necessitating tedious proofreading.

Links

Web links and URLs should be included in the reference list. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, in the following format: **The Mouse Tumor Biology Database** [http://tumor.informatics.jax.org/cancer_links.html]

Journal of Biological Engineering reference style

Article within a journal

1. Koonin EV, Altschul SF, Bork P: **BRCA1 protein products: functional motifs**. *Nat Genet* 1996, **13**:266-267.

Article within a journal supplement

2. Orengo CA, Bray JE, Hubbard T, LoConte L, Sillitoe I: **Analysis and assessment of ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction**. *Proteins* 1999, Suppl 3:149-170.

In press article

3. Kharitonov SA, Barnes PJ: **Clinical aspects of exhaled nitric oxide**. *Eur Respir J*, in press.

Published abstract

4. Zvaifler NJ, Burger JA, Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Maini RN: **Mesenchymal cells, stromal derived factor-1 and rheumatoid arthritis [abstract]**. *Arthritis Rheum* 1999, **42**:s250.

Article within conference proceedings

5. Jones X: **Zeolites and synthetic mechanisms**. In *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Edited by Smith Y. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996:16-27.

Book chapter, or article within a book

6. Schnepf E: **From prey via endosymbiont to plastids: comparative studies in dinoflagellates**. In *Origins of Plastids. Volume 2*. 2nd edition. Edited by Lewin RA. New York: Chapman and Hall; 1993:53-76.

Whole issue of journal

7. Ponder B, Johnston S, Chodosh L (Eds): **Innovative oncology**. In *Breast Cancer Res* 1998, **10**:1-72.

Whole conference proceedings

8. Smith Y (Ed): *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996.

Complete book

9. Margulis L: *Origin of Eukaryotic Cells*. New Haven: Yale University Press; 1970.

Monograph or book in a series

10. Hunninghake GW, Gadek JE: **The alveolar macrophage**. In *Cultured Human Cells and Tissues*. Edited by Harris TJR. New York: Academic Press; 1995:54-56. [Stoner G (Series Editor): *Methods and Perspectives in Cell Biology*, vol 1.]

Book with institutional author

11. Advisory Committee on Genetic Modification: *Annual Report*. London; 1999.

PhD thesis

12. Kohavi R: **Wrappers for performance enhancement and oblivious decision graphs**. *PhD thesis*. Stanford University, Computer Science Department; 1995.

Link / URL

13. **The Mouse Tumor Biology Database** [http://tumor.informatics.jax.org/cancer_links.html]

Microsoft Word template

Although we can accept manuscripts prepared as Microsoft Word, Word Perfect, RTF or PDF files, we have designed a Microsoft Word template that can be used to generate a standard style and format for your article. It can be used if you have not yet started to write your paper, or if it is already written and needs to be put into *Journal of Biological Engineering* style.

Download the template (Mac and Windows compatible Word 1998/2000) from our site, and save it to your hard drive. Double click the template to open it.

How to use the *Journal of Biological Engineering* template

The template consists of a standard set of headings that make up a *Journal of Biological Engineering* Research manuscript, along with dummy fragments of body text. Follow these steps to create your manuscript in the standard format:

- Replace the dummy text for Title, Author details, Institutional affiliations, and the other sections of the manuscript with your own text (either by entering the text directly or by cutting and pasting from your own manuscript document).
- If there are sections which you do not need, delete them (but check the rest of the Instructions for Authors to see which sections are compulsory).
- If you need an additional copy of a heading (e.g. for additional figure legends) just copy and paste.
- For the references, you may either manually enter the references using the [reference style](#) given, or use bibliographic software to insert them automatically. We provide [style files](#) for End Note and Reference Manager.

For extra convenience, you can use the template as one of your standard Word templates. To do this, put a copy of the template file in Word's 'Templates' folder, normally C:\Program Files\Microsoft Office\Templates on a PC. The next time you create a new document in Word using the File menu, the template will appear as one of the available choices for a new document.

Note - From version 6, EndNote includes a full set of structured article templates for BioMed Central journals. Users of EndNote are encouraged to upgrade if necessary and make use of these templates. More information is [available here](#).

[return to top](#)

Preparing illustrations and figures

Figures should be provided as separate files. Each figure should comprise only a single file. There is no charge for the use of color.

Please read our [figure preparation guidelines](#) for detailed instructions on maximising the quality of your [figures](#).

Formats

The following file formats can be accepted:

- **EPS** (preferred format for diagrams)
- **PDF** (also especially suitable for diagrams)
- **PNG** (preferred format for photos or images)
- Microsoft Word (version 5 and above; figures must be a single page)
- PowerPoint (figures must be a single page)
- TIFF
- JPEG

- BMP
- CDX (ChemDraw)
- TGF (ISIS/Draw)

Figure legends

The legends should be included in the main manuscript text file immediately following the references, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

[return to top](#)

Preparing tables

Each table should be numbered in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title that summarizes the whole table, maximum 15 words. Detailed legends may then follow, but should be concise.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in portrait format (note that tables on a landscape page must be reformatted onto a portrait page or submitted as additional files). These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Columns and rows of data should be made visibly distinct by ensuring the borders of each cell display as black lines. Commas should not be used to indicate numerical values. Colour and shading should not be used.

Larger datasets can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, published form of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

[return to top](#)

Preparing additional files

Although *Journal of Biological Engineering* does not restrict the length and quantity of data in a paper, there may still be occasions where an author wishes to provide data sets, tables, movie files, or other information as additional information. These files can be uploaded using the 'Additional Material files' button in the manuscript submission process.

The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission.

Any additional files will be linked into the final published article in the form supplied by the author, but will not

be displayed within the paper. They will be made available in exactly the same form as originally provided.

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text, immediately following the tables (if any):

- File name
- File format (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

Additional datafiles should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'See additional file 1: Movie1 for the original data used to perform this analysis'.

Formats and uploading

Ideally, file formats for additional files should not be platform-specific, and should be viewable using free or widely available tools. The following are examples of suitable formats.

- Additional documentation
 - PDF (Adobe Acrobat)
- Animations
 - SWF (Shockwave Flash)
- Movies
 - MOV (QuickTime)
 - MPG (MPEG)
- Tabular data
 - XLS (Excel spreadsheet)
 - CSV (Comma separated values)

As with figure files, files should be given the standard file extensions. This is especially important for Macintosh users, since the Mac OS does not enforce the use of standard extensions. Please also make sure that each additional file is a single table, figure or movie (please do not upload linked worksheets or PDF files larger than one sheet).

Mini-websites

Small self-contained websites can be submitted as additional files, in such a way that they will be browsable from within the full text HTML version of the article. In order to do this, please follow these instructions:

1. Create a folder containing a starting file called index.html (or index.htm) in the root
2. Put all files necessary for viewing the mini-website within the folder, or sub-folders
3. Ensure that all links are relative (ie "images/picture.jpg" rather than "/images/picture.jpg" or "http://yourdomain.net/images/picture.jpg" or "C:\Documents and Settings\username\My Documents\mini-website\images\picture.jpg") and no link is longer than 255 characters
4. Access the index.html file and browse around the mini-website, to ensure that the most commonly used browsers (Internet Explorer and Firefox) are able to view all parts of the mini-website without problems, it is ideal to check this on a different machine

5. Compress the folder into a ZIP, check the file size is under 20 MB, ensure that index.html is in the root of the ZIP, and that the file has .zip extension, then submit as an additional file with your article

[return to top](#)

Style and language

General

Currently, *Journal of Biological Engineering* can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

Gene names should be in italic, but protein products should be in plain type.

There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise. There is also no restriction on the number of figures, tables or additional files that can be included with each article online. Figures and tables should be sequentially referenced. Authors should include all relevant supporting data with each article.

Journal of Biological Engineering will not edit submitted manuscripts for style or language; reviewers may advise rejection of a manuscript if it is compromised by grammatical errors. Authors are advised to write clearly and simply, and to have their article checked by colleagues before submission. In-house copyediting will be minimal. Non-native speakers of English may choose to make use of a copyediting service.

Help and advice on scientific writing

The abstract is one of the most important parts of a manuscript. For guidance, please visit our page on "[Writing titles and abstracts for scientific articles](#)".

Tim Albert has produced for BioMed Central a [list of tips](#) for writing a scientific manuscript. [MedBioWorld](#) also provides a list of resources for science writing.

Abbreviations

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They can be defined when first used or a list of abbreviations can be provided preceding the acknowledgements and references.

Typography

- Please use double line spacing.
- Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.
- Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.
- Capitalise only the first word, and proper nouns, in the title.
- All pages should be numbered.
- Use the *Journal of Biological Engineering* reference format.
- Footnotes to text should not be used.
- Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full. **Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.**

ANNEXE B

Instructions aux auteurs pour article 2 (Water Research)

Source :

http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/309/authorinstructions

WATER RESEARCH

A Journal of the International Water Association (IWA)

<http://www.iwahq.org.uk>

Guide for Authors

1. Submission

All manuscripts should be submitted electronically through Elsevier Editorial System (EES) which can be accessed at <http://ees.elsevier.com/wr>. With the submitted manuscript authors should provide the names, addresses and e-mail addresses of four potential reviewers.

Submission of a paper implies that it has not been published previously - also not in any other language-, that it is not under consideration for publication elsewhere, and that if accepted it will not be published elsewhere in the same form, or in any other language, without the written consent of the publisher.

2. Types of Contribution

Papers are published either as a Full Paper or a Review Paper. Comments on these papers are also welcome.

(a) A FULL PAPER is a contribution describing original research, including theoretical exposition, extensive data and in-depth critical evaluation, and is peer reviewed. The total length of a manuscript including figures, tables and references must not exceed 8000 words (40 pages).

(b) REVIEW PAPERS are encouraged, but the Editor-in-Chief must be consulted beforehand, in order to decide if the topic is relevant. Only critical review papers will be considered. The format and length of review papers are more flexible than for a full paper. Review papers are peer reviewed.

(c) COMMENTS on papers already published are welcome, subject to the criteria of interest, originality and the approval of the appropriate Editor. Comments can include extensions to, or criticisms of, those papers. They must provide arguments that are reasoned, and not presented in a confrontational fashion. They will be sent to the author of the original paper for reply, the outcome of which may be publication in a future issue. Comments and Authors' Replies should not exceed 1200 words each and will be received until 4 months after publication. They will be accepted or rejected without corrections.

3. Paper Submission

(a) All types of accepted submissions will have been peer reviewed.

(b) Papers must be in English. Use professional help if English is not your mother tongue. Language Polishing: Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> or contact

authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions ➡ http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions

(c) Manuscripts must be in double-spaced form with wide margins and line numbering. A font size of 12 pt is required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses (including e-mail addresses) must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal or the journal's website ➡ <http://www.elsevier.com/locate/watres> for style if possible. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity.

(d) Multi-part papers are not to be considered.

(e) Papers that are requested by the editors to be revised must be returned within 4 weeks or they will be regarded as withdrawn.

(f) No page charges apply for Water Research.

(g) The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints (additional copies can be ordered at current printing prices). The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional copies can be ordered at current printing prices.

(h) Submitted papers should be accompanied by a list of 4 potential referees with names and addresses.

4. Content

All pages must be numbered consecutively. Words normally italicised must be typed in italics or underlined. A manuscript would normally include a title, abstract, key words, introduction, materials and methods, results, discussion, conclusions and references.

(a) Title page. The title page must state the names and full addresses of all authors. Telephone, fax and E-mail numbers must also be included for the corresponding author to whom proofs will be sent.

(b) Abstract. Authors are requested to ensure that abstracts for all types of contribution give concise factual information about the objectives of the work, the methods used, the results obtained and the conclusions reached. A suitable length is about 150 words.

(c) Key words. Authors must list immediately below the abstract up to 6 key words (not phrases) that identify the main points in their paper.

(d) Abbreviations and Notations. Nomenclature must be listed at the beginning of the paper and must conform to the system of standard SI units. Acronyms and abbreviations must be spelled out in full at their first occurrence in the text. Authors should consult - Notation for Use in the Description of Wastewater Treatment Processes', Water Res. 1987;(21)2:135-9.

(e) Conclusions. Papers must end with a listing of major conclusions, preferably in a list form.

(f) References. References to published literature must be cited in the text as follows:

Li and Gregory (2006) - The date of publication in parentheses after the authors' names. References must be listed together at the end of each paper and must not be given as footnotes. For other than review papers authors should aim to give no more than 20-30 recent, relevant references. They must be listed alphabetically starting with the surname of the first author, (year) followed by the title of the referenced paper and the full

name of the periodical, as follows:

Li, G. and Gregory, J. (2006) Flocculation and sedimentation of high-turbidity waters. *Water Research* 25(9), 1137-1143.

It is particularly requested that (i) authors' initials, (ii) the title of the paper, and (iii) the volume, part number and first and last page numbers are given for each reference.

References to books, reports and theses must be cited in the narrative. They must include the author(s), date of publication, title of book, editor(s) name(s) if applicable, page numbers, name of publisher, and place of publication. The abbreviation et al. may be used in the text. However, the names of all authors must be given in the list of references. Personal communications and other unpublished works must be included in the reference list, giving full contact details (name and address of communicator).

Personal communications must be cited in the text as, for example, Champney (2006).

References in languages other than English must be referred to by an English translation (with the original language indicated in parentheses).

Citing and listing of web references. As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (author names, dates, reference to a source publication etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

The digital object identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes.

Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information.

The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

(g) Illustrations and Tables. The total number of all illustrations and tables should not exceed 10. If illustrations need to take up more space than 2 printed pages in *Water Research* (1 page for shorter contributions) the number of words must be reduced accordingly. All illustrations must be clear and of good quality. Scale bars should be used instead of magnifications, as these change if the photograph is reduced. Tables and their headings must be typed on a separate sheet. Type must be clear and even across columns. Particular care must be taken with nomenclature and sub- and superscripts to ensure correct alignment. Horizontal and vertical lines must be inserted to define rows and columns, and column headings must be correctly aligned.

(h) Colour Illustrations: If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Supplementary data

Preparation of supplementary data. Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and

more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

5. Proofs

Corrections to proofs must be restricted to printer's errors. Please check proofs carefully before return, because late corrections cannot be guaranteed for inclusion in the printed journal. Authors are particularly requested to return their corrected proofs to Elsevier as quickly as possible to maintain their place in the printing schedule.

6. Transfer of Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>).

If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>

Online Publication Your article will appear on Elsevier's online journal database ScienceDirect as an "Article in Press" within approximately 4-6 weeks of acceptance. Articles in Press for this journal can be viewed at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/00431354>. An Article in Press may be cited prior to its publication by means of its unique digital object identifier (DOI) number, which does not change throughout the publication process.

Reprints The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints (additional copies can be ordered at current printing prices). The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional copies can be ordered at current printing prices.

Author Discount Contributors to Elsevier journals are entitled to a 30% discount on most Elsevier books, if ordered directly from Elsevier.

ANNEXE C

Respirométrie LSS effectuée sur le milieu filtrant par le CRIQ

Date d'échantillonnage : 2006-05-30

Description	RO ₂ N spécifique	N nitrifié théorique
	Mg-O ₂ /g-MVES*h	Mg-N/g-MVES*h
Cageot 1'	0,71	0,1634
Cageot 2'	0,05	0,0117
Cageot 3'	-0,05	-0,0105

Date d'échantillonnage : 2006-06-21

Description	RO ₂ N spécifique	N nitrifié théorique
	Mg-O ₂ /g-MVES*h	Mg-N/g-MVES*h
Cageot 1'	0,22	0,0500
Cageot 2'	-0,09	-0,0210
Cageot 3'	0,10	0,0226

Date d'échantillonnage : 2006-07-12

Description	RO ₂ N spécifique	N nitrifié théorique
	Mg-O ₂ /g-MVES*h	Mg-N/g-MVES*h
Cageot 1'	0,40	0,0926
Cageot 2'	0,05	0,0120
Cageot 3'	0,04	0,0084
Composé biofiltre 1'	0,07	0,0166

Date d'échantillonnage : 2007-01-23

Description	RO ₂ N spécifique	N nitrifié théorique
	Mg-O ₂ /g-MVES*h	Mg-N/g-MVES*h
Cageot 1'	0,30	0,0691
Cageot 2'	0,17	0,0402
Cageot 3'	0,75	0,1727
Cageot blanc 1'	0,22	0,0511
Cageot blanc 3'	0,06	0,0146
Composé biofiltre 1'	0,27	0,0630

* Cageot 1', 2', 3' : Échantillons pris dans le cageot d'échantillonnage du biofiltre, à différentes profondeurs (1' est la strate supérieure, 3' la strate la plus profonde).

*Cageot blanc 1', 3' : Échantillons provenant d'un cageot d'échantillonnage contenant du milieu filtrant neuf, non-ensemencé par des bactéries nitrifiantes.

*Composé biofiltre 1' : Échantillons composés de trois endroits différents du biofiltre, à 1' de la surface.

ANNEXE D

Tests de pH dans le milieu inorganique de Engel et Alexander

Date d'échantillonnage : 2006-05-30

Description	Temps pour changer de pH
	(de 8,0 à 6,0)
Cageot 1'	11 j
Cageot 2'	11 j
Cageot 3'	14 j

Date d'échantillonnage : 2006-06-21

Description	Temps pour changer de pH
	(de 8,0 à 6,0)
Cageot 1'	> 20 j
Cageot 2'	> 20 j
Cageot 3'	> 20 j

Date d'échantillonnage : 2006-07-12

Description	Temps pour changer de pH
	(de 8,0 à 6,0)
Cageot 1'	> 20 j
Cageot 2'	> 20 j
Cageot 3'	> 20 j
Composé biofiltre 1'	> 20 j

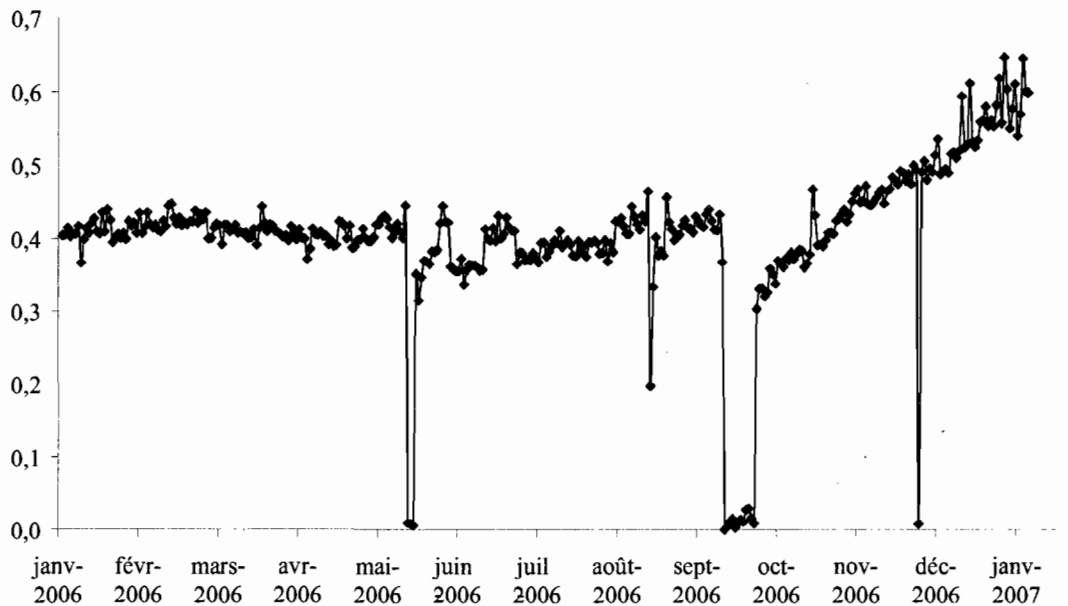
Date d'échantillonnage : 2007-01-23

Description	Temps pour changer de pH (de 8,0 à 6,0)
Cageot 1'	> 20 j
Cageot 2'	> 20 j
Cageot 3'	11 j
Composé biofiltre 1'	> 20 j

ANNEXE E

Suivi du différentiel de pression du biofiltre

Différentiel de pression à travers le Biofiltre (kPaG)



- Les baisses importantes du différentiel de pression sont dues aux arrêts du bioréacteur pour entretien mécanique (mai, août, septembre et novembre 2006).
- Le différentiel de pression augmente constamment entre octobre 2006 et janvier 2007.

ANNEXE F
Bilan d'azote du bioréacteur

Date	Entrée SPEFs	Entrée Floculant	Sortie Eau	Sortie Air	Sortie Boues
05-01-16	38,2	0,8	38,7	12,1	1,5
05-04-09	43,4	1,3	4,6	3,8	1,2
05-05-10	43,0	1,1	18,2	4,8	1,7
05-06-15	34,3	0,5	26,7	1,3	0,3
05-07-14	77,1	1,9	13,6	3,6	0,6
05-08-09	87,6	1,9	73,2	3,7	1,9
05-09-22	85,1	1,7	23,4	5,7	0,5
05-11-30	98,7	1,7	73,6	5,7	1,6
05-12-13	69,4	0,6	47,3	17,3	0,6
06-01-20	110,9	2,2	80,9	14,1	2,2
06-03-07	144,9	2,5	128,6	13,3	3,3
06-06-07	114,7	2,2	51,0	3,3	1,1
06-08-08	64,7	2,1	53,6	4,6	1,7

Date	Total Entrée	Total Sortie	BILAN (Entrée - Sortie)
05-04-09	44,7	9,6	35,1
05-05-10	44,1	24,7	19,4
05-06-15	34,8	28,3	6,5
05-07-14	79,0	17,8	61,2
05-08-09	89,5	78,8	10,7
05-09-22	86,8	29,6	57,2
05-11-30	100,4	80,9	19,5
05-12-13	70,0	65,2	4,8
06-01-20	113,1	97,2	15,9
06-03-07	147,4	145,1	2,2
06-06-07	117,0	55,4	61,6
06-08-08	66,8	59,9	6,8
			Moyenne : 22,1

* Les mesures sont en kg-N / jour.

* Bilan effectué sur 13 journées entre 2005 et 2006, pour lesquelles les mesures d'azote étaient accessibles.

* Les résultats montrent qu'une moyenne de 22,1 kg-N / jour entrant dans le procédé n'est pas mesuré à la sortie.